



Entwicklung, Validierung und Anwendung einer LC-MS Methode zur quantitativen Bestimmung von Niacin und zweier Metaboliten in Humanplasma

Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

von Dipl.-Chem. Peter Pfuhl
aus Laupheim, Kreis Biberach

Frankfurt am Main (2005)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main als Dissertation angenommen

Dekan Prof. Dr. H. Schwalbe

Gutachter Prof. Dr. M. Schubert-Zsilavecz
 Prof. Dr. M. Karas

Datum der Disputation : 26.07.2006

Meiner lieben Familie gewidmet!

*"Man kann in Gesellschaft unterrichtet werden,
aber man wird nur in Einsamkeit inspiriert"*
Johann Wolfgang von Goethe

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand unter Betreuung von Herrn Professor Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz im Rahmen einer Kooperation der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt und der Firma AAI Deutschland GmbH in Neu-Ulm.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz für die Bereitschaft mich als externen Doktoranden zu betreuen und mir die vorliegende Arbeit zu ermöglichen

Darüberhinaus bedanke ich mich bei den jetzigen und damaligen Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt, Frau Dr. Mona Tawab , Frau Dr. Astrid Kaunzinger und Herrn Dr. Mario Wurglics für das stets offene Ohr und für die Unterstützung bei der Anfertigung der zu dieser Dissertation zugehörigen Publikation.

Ein grosser Dank gilt meinen Vorgesetzten bei AAI Deutschland GmbH in Neu-Ulm, Herrn Dr. Norbert Häring, Herrn Dr. Uwe Kärcher und dem leider viel zu früh verstorbenen Herrn Dr. Alwin Baumeister (†), die mich stets gefördert haben und es mir ermöglicht haben diese Dissertation samt Publikation neben meiner täglichen Arbeit anzufertigen und Analysengeräte, Laborgeräte und Chemikalien dafür zu benutzen.

Darüberhinaus bedanke ich mich bei meinen Arbeitskollegen, die alle auf verschiedene Arten zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein allergrösster Dank geht natürlich an meine Familie, die viel Geduld haben musste bis diese Arbeit in der jetzigen Form vorlag.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung.....	8
1. Allgemeines und Aufgabenstellung	11
1.1. Niacin, physiologische Bedeutung, Metabolismus und Analytik	11
1.1.1. Therapeutische Bedeutung	11
1.1.2. Metabolismus.....	12
1.1.3. Analytik	15
1.2. LC-MS – Allgemeines.....	19
1.2.1. HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	19
1.2.2. LC-Tandem Massenspektrometrie in der Bioanalytik.....	24
1.2.3. Ionisierungsarten in der LC-MS	26
1.2.3.1. Elektrospray – Ionisation (ESI).....	26
1.2.3.2. Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI).....	28
1.2.4. Ionensuppression.....	29
1.2.5. Massenspektrometrie mittels der Ion-Trap Technik	30
1.2.6. Extraktionsmethoden in der LC-MS	33
1.2.6.1. Flüssig-Flüssig Verteilung	33
1.2.6.2. Festphasen-Extraktion (SPE).....	33
1.2.6.3. Proteinfällung	34
1.2.6.4. Online- Aufarbeitungsmethoden	34
2. Experimenteller Teil – Methodenentwicklung	35
2.1. Massenspektren von Nikotinsäure, Nikotinamid und Nikotinursäure.....	36
2.2. Entwicklung der chromatographischen Methode mittels reiner Lösungen..	40
2.3. Erste Extraktionsversuche von Niacin und dessen Metaboliten aus Humanplasma	43
2.3.1. Flüssig-Flüssig Verteilung	43
2.3.2. Festphasenextraktion.....	44
2.3.3. Proteinfällung	45
2.3.4. Säulenschaltung	46
2.3.5. kombinierte Methoden.....	46
2.4. Optimierung der Chromatographiebedingungen mit anderer stationärer Phase (CPS)	53

2.5.	Wiederholung der Extraktionsversuche mit ausreichend selektiver Chromatographie.....	54
2.6.	Auswahl eines Internen Standards.....	56
3.	Validierung der bioanalytischen Methode.....	60
3.1.	Überblick über die verwendeten Chemikalien und Geräte	60
3.1.1.	Lösemittel, Reagenzien und Festphasensäulen	60
3.1.2.	Laborgeräte und LC-Geräte	60
3.1.3.	Referenzsubstanzen	61
3.1.4.	Herstellung der Stammlösungen.....	61
3.1.4.1.	Stammlösungen Nikotinsäure	61
3.1.4.2.	Stammlösungen Nikotinsäureamid und Nikotinursäure	61
3.1.4.3.	Stammlösung des Internen Standards 3-Chinolin-Carbonsäure ..	62
3.1.5.	Herstellung der Kalibrierstandards und Qualitäts (QC-) Kontrollproben	62
3.1.5.1.	Herstellung der Kalibrierstandards.....	62
3.1.5.2.	Herstellung der Qualitäts-Kontrollproben	63
3.1.5.3.	Arbeitslösung des Internen Standards	64
3.1.6.	Verarbeitung der elektronischen Daten.....	64
3.2.	Arbeitsanweisungen	65
3.2.1.	Extraktionsvorschrift.....	65
3.2.2.	LC-Bedingungen	65
3.2.3.	MS-Bedingungen	66
3.2.3.1.	Allgemeine Geräteparameter	66
3.2.3.2.	Scan Modus Einstellungen.....	67
3.2.4.	Auswertung	67
3.2.4.1.	Berechnung der Konzentrationen der Analyten	68
3.2.4.2.	Richtigkeit und Genauigkeit der Messungen.....	68
3.3.	Ergebnisse der Validierung	70
3.3.1.	Leistungsfähigkeit der Methode	70
3.3.1.1.	Interday Richtigkeit und Genauigkeit	70
3.3.1.2.	Intra-Day Richtigkeit und Genauigkeit.....	76
3.3.1.3.	Kalibrierungsmethode und Linearität	78
3.3.1.4.	Statistische Daten der gesamten Validierung	79
3.3.1.5.	Untere Bestimmungsgrenze - LLOQ.....	82

3.3.2.	Selektivität.....	84
3.3.2.1.	Blank-Matrix	84
3.3.2.2.	Blutabnahmesysteme.....	85
3.3.3.	Stabilitätstests.....	86
3.3.3.1.	Stabilität in Plasma bei Raumtemperatur und Tageslicht.....	86
3.3.3.2.	Stabilität in Plasma bei $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ (Aufbewahrung im Gefrierschrank)	89
3.3.3.3.	Stabilität nach wiederholten Einfrier-/Auftauzyklen	90
3.3.3.4.	Stabilität im Extrakt bei Raumtemperatur.....	92
3.3.3.5.	Stabilität im Extrakt im Kühlschrank ($5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) , 72h.....	94
3.3.3.6.	Stabilität im Extrakt im Autosampler , 72h.....	95
3.3.3.7.	Stabilität während der Probengewinnung (Stabilität in Vollblut) ...	96
3.3.4.	Extraktionsausbeute	98
3.3.5.	Probenverdünnung	100
3.4.	Akzeptanzkriterien:.....	101
3.5.	Übersicht über die Validierungsergebnisse	102
3.6.	Pharmakokinetische Ergebnisse aus klinischen Studien.....	104
	Zusammenfassung	108
	Summary	110
	Literaturverzeichnis	111
	Tabellenverzeichnis.....	116
	Abbildungsverzeichnis.....	119
	Lebenslauf – Curriculum Vitae.....	120

Einleitung

Mit seiner bedeutenden Rolle im Eiweiß-, Fett- und Kohlenhydratestoffwechsel zählt Niacin (Nikotinsäure, 3-Pyridincarbonsäure) zu den wichtigen Vitaminen in unserem Körper. So trägt es wesentlich zur Energiegewinnung bei, ist an vielen enzymatischen Vorgängen beteiligt und besitzt ebenso antioxidative Wirkung. Des weiteren ist Niacin wichtig für die Regeneration von Haut, Muskeln und Nerven. Niacin sowie sein Metabolit Niacinamid sind wasserlösliche Bestandteile des Vitamin B Komplexes. Einen weiteren Metaboliten stellt das Glycin-Konjugat des Niacin, die Nikotinursäure, dar.

Es wird empfohlen, täglich 10-15 mg Niacin mit der Nahrung zu sich zu nehmen. Aus eiweißreichen Lebensmitteln wie Fleisch und Fisch kann der Körper Niacin gewinnen. Kaffee, Vollkornprodukte, verschiedene Gemüse und Obst enthalten das Vitamin zwar auch, allerdings kann es aus tierischen Produkten grundsätzlich besser vom Organismus verwertet werden.

Niacinmangel ruft Hautveränderungen (Dermatitis), Durchfall und Depressionen hervor. Nach dem sichtbarsten der Anzeichen wird dieser Symptomkomplex auch als Pellagra (= raue Haut) bezeichnet.

Darüber hinaus ist Niacin ein seit langem bekannter Wirkstoff bei der Therapie von Fettstoffwechselstörungen, insbesondere bei Patienten mit kombinierter Dyslipidämie, die erhöhte LDL-Cholesterin und Triglyzerid sowie niedrige HDL-Werte aufweisen [1,2,3,4,5]. Von der American Heart Association und vom NIH im „National Cholesterol Lowering Program 1997“ wird Niacin als gleichwertig mit anderen Lipidsenkern beschrieben. Vor allem Triglyzeride können mit Niacin um 30-50% effektiv gesenkt werden. Im Vergleich zu Statinen, die den LDL-Wert um 32% senken, führt Niacin allerdings nur zu einer Reduktion um 23% [6]. Der Vorteil von Niacin liegt aber in der gleichzeitigen Erhöhung des HDL-Wertes um 33%, während Statine hier kaum Effekte zeigen. Insgesamt wird daher mit Niacin ein verbessertes LDL/HDL Verhältnis erreicht.

Vor diesem Hintergrund wird Niacin zunehmend auch in Kombination mit Statinen eingesetzt zumal aufgrund retardierender Formulierungen einige der unerwünschten

Einleitung

Nebenwirkungen des hochdosierten Niacin wie z.B. Hautverfärbungen umgangen werden konnten [7,8,9,10,11,12].

Außerdem senkt Niacin den Risikofaktor Lp(a) um 35%, auf den Statine keinen Einfluss haben und kann somit vorbeugend gegen Erkrankungen der Herzkranzgefäße eingesetzt werden, wie in klinischen Studien nachgewiesen wurde [13,14].

Die pharmakologische Wirkung von Niacin tritt bei Plasmaspiegeln von 0.100 – 0.400 µg/mL auf [15,16]. Wegen seines raschen Metabolismus im Organismus wird jedoch eine relativ hohe Dosierung (1.60 – 6.00 g/Tag) [17] benötigt, um die pharmakologische Aktivität aufrecht zu erhalten.

In der Literatur sind einige Methoden zur Bestimmung von Niacin in Plasma beschrieben [18-30]. Hierbei handelt es sich zumeist um HPLC-Methoden mit UV-Detektion oder fluorimetrischer Bestimmung sowie einer GC-MS Methode [30]. Mittels UV Detektion konnte Niacin bis zu einer Bestimmungsgrenze von 0.1 µg/mL gemessen werden [26]. Geringere Nachweisgrenzen von Niacin und Niacinamid konnten nur mittels fluorimetrischer Bestimmung nach vorausgegangener zeitaufwendiger Probenaufarbeitung, Derivatisierung und für die Routine ungeeigneter Chromatographie erzielt werden [21,25,28].

Die meisten der obengenannten Verfahren sind sehr zeitaufwendig und schließen langwierige Probenaufbereitungsschritte ein, da Niacin und seine Metaboliten zum Teil erhebliche Unterschiede in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften aufweisen, was wiederum eine Simultanbestimmung erschwert.

Vorwiegend erfolgte die Probenaufarbeitung mittels Proteinfällungen, entweder mit Aceton oder Aceton/Wasser [21,26], Acetonitril [24] oder Perchlorsäure [22]. In anderen Methoden folgt einer Proteinfällung mit Aceton ein Reinigungsschritt der wässrigen Phase, die Niacin enthält, mit Chloroform, um die weiteren endogenen fettlöslichen Stoffe zu entfernen. [18,21]. In diesem Zusammenhang wurde bereits berichtet, dass wässrige Phasen, die auf diesem Wege gewonnen wurden, die notwendige Reinheit für HPLC Analysen nicht aufweisen [20]. Ebenso wurden Festphasenextraktionen (SPE) eingesetzt, um Niacin und seine Metaboliten von biologischen Matrices zu trennen [19,25,27,31]. Aufgrund ihrer verschiedenen pKs Werte und ihrer verschiedenen hydrophoben Eigenschaften konnte SPE jedoch nicht für alle Metaboliten von Niacin und Niacinamid angewandt werden.

In jüngster Zeit wurden zunehmend kapillarelektrophoretische Methoden zur Simultanbestimmung von Niacin und seiner Metaboliten entwickelt. Nach aufwendiger Probenaufarbeitung wurden hiermit allerdings nur Bestimmungsgrenzen von bis zu 1 µg/mL erreicht [26,29].

Mittlerweile hat sich die LC-MS als die vorherrschende Analysentechnik für die Analyse von Biomolekülen und Wirkstoffen in biologischen Matrices durchgesetzt. Obwohl diese Technik in der Regel geringe Anforderungen an die Probenaufarbeitung stellt, eine bessere Bestimmungsgrenze im Vergleich zur LC-UV-Kopplung erlaubt und darüber hinaus einen hohen Probendurchsatz ermöglicht, wurde bisher in der Literatur keine LC-MS Methode zur quantitativen Bestimmung von Niacin beschrieben.

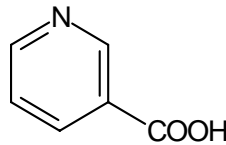
Angesichts der weiterhin aktuellen pharmakologischen und therapeutischen Bedeutung von Niacin, spielt die Analytik dieser Verbindung sowie seiner Metaboliten eine wichtige Rolle.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher eine empfindliche LC-MS Methode zur simultanen, quantitativen Bestimmung von Niacin und seiner beiden primären Metaboliten, Niacinamid und Nikotinursäure, zu entwickeln, die zudem die Anforderungen bestehender internationaler Richtlinien für die Validierung einer Analysenmethode erfüllt [32,33,34].

1. Allgemeines und Aufgabenstellung

1.1. Niacin, physiologische Bedeutung, Metabolismus und Analytik

Niacin (Nikotinsäure, 3-Pyridincarbonsäure) (NA) zählt zu den wasserlöslichen Bestandteilen des Vitamin B Komplexes.



Struktur von Niacin (NA) ; Molekulargewicht 123.1 g/mol

1.1.1. Therapeutische Bedeutung

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, stellt Niacin neben anderen Lipidsenkern einen bedeutsamen Wirkstoff bei der Therapie von Fettstoffwechselstörungen dar [35] .

Die zur Zeit im Handel befindlichen Lipidsenker lassen sich im wesentlichen folgenden Arzneistoffgruppen zuordnen:

- Statine

Die Cholesterin-Synthese-Hemmer (CSE-Hemmer = HMG-CoA-Reduktasehemmer) verhindern die körpereigene Bildung von Cholesterin in der Leber, die ca. 50 % des im Blut messbaren Cholesterins ausmacht. Die Leber deckt daraufhin ihren Bedarf an Cholesterin für den Aufbau von Gallensäuren vermehrt aus dem LDL-Cholesterin des Blutes, dessen Konzentration im Blut dadurch abnimmt [36]. Durch diesen Eingriff in den Fettstoffwechsel kann das gefäßschädigende LDL-Cholesterin um 20-50% des Ausgangswertes gesenkt werden.

Bekannte Vertreter dieser Gruppe sind u.a. Simvastatin und Atorvastatin.

- Fibrate

Die Fibrate wie z.B. Fenofibrat oder Bezafibrat leiten sich von der Clofibrinsäure ab, deren lipidsenkende Wirkung schon seit langem bekannt ist. Sie gehören zur Familie der PPAR α -Aktivatoren. PPAR α -Aktivierung führt zu einer signifikanten Senkung des

Triglyceridspiegels im Blut, hat jedoch nur geringe Auswirkung auf den LDL-Cholesterinspiegel [37].

- Sitosterin

Sitosterin senkt den LDL-Cholesterinspiegel durch Verhinderung der Resorption des Cholesterins aus der Nahrung [38].

Von allen Lipidsenkern stellt Niacin im Augenblick den einzigen Wirkstoff dar, der alle bedeutenden Lipid-Bestandteile vorteilhaft beeinflusst. So ist Niacin in der Lage die Spiegel an Gesamt-Cholesterol, low density lipoprotein (LDL), Lipoprotein(a) und Triglyceriden entscheidend zu senken, wohingegen der Spiegel an high density lipoprotein (HDL) erhöht wird [39].

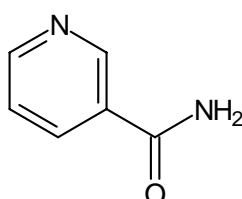
Es wird vermutet, dass Niacin mit einem Rezeptor in der Adipozyten-Zellmembran interagiert, wobei der physiologische Rezeptor noch nicht identifiziert werden konnte. Die Bindung von Nicotinsäure bewirkt via Aktivierung eines Gi-Proteins die Senkung von cAMP (cyclisches Adenosin Mono-Phosphat). Dies inhibiert hormonsensitive Lipasen und hat zur Folge, dass weniger Triglyceride gespalten und als freie Fettsäuren in das Blut abgegeben werden [40].

Es besteht die große Hoffnung, dass nach Identifikation des Niacin Rezeptors weitere Wirkstoffe, für die Behandlung von Störungen des Fettstoffwechsels entwickelt werden können [41].

1.1.2. Metabolismus

Der komplette Metabolismus von Niacin ist gut erforscht [42]. So wird bei oraler Verabreichung Niacin hauptsächlich zu folgenden beiden Verbindungen metabolisiert :

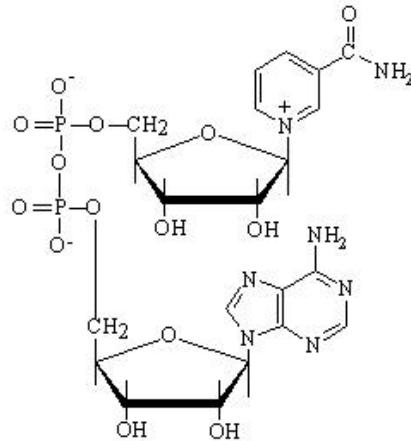
- a) zum zugehörigen Säureamid, das Niacinamid (Nikotinamid) (NAM), welches einen wichtigen Metaboliten darstellt [42].



Allgemeines und Aufgabenstellung

Struktur von Niacinamid (NAM) ; Molekulargewicht 122.1 g/mol

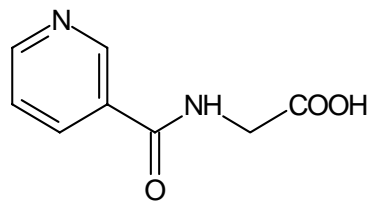
Niacinamid ist ein Bestandteil von NAD (Nikotinamid Adenin Dinukleotid), ein bedeutendes Co-Enzym für viele zelluläre Redoxreaktionen, da es als Wasserstoffüberträger fungiert.



Struktur von NAD

Niacin und Niacinamid sind sich in ihrer Funktion als Vitamine ähnlich, differieren jedoch in ihrer pharmakologischen Wirkungsweise, da Niacinamid keinen Einfluss auf Blutfette ausübt [43].

b) zur Nikotinursäure, ein Glycin-Konjugat von Niacin.



Struktur von Nikotinursäure (NUR) ; Molekulargewicht 180.2 g/mol

Nikotinursäure ist zwar der primäre Metabolit von Niacin [42,44,45], stellt jedoch im Gegensatz zu Niacinamid einen inaktiven Metaboliten dar.

c) weitere Metaboliten

Der komplette Metabolismus von Niacin ist in Abbildung 1 auf der folgenden Seite zusammengefasst.

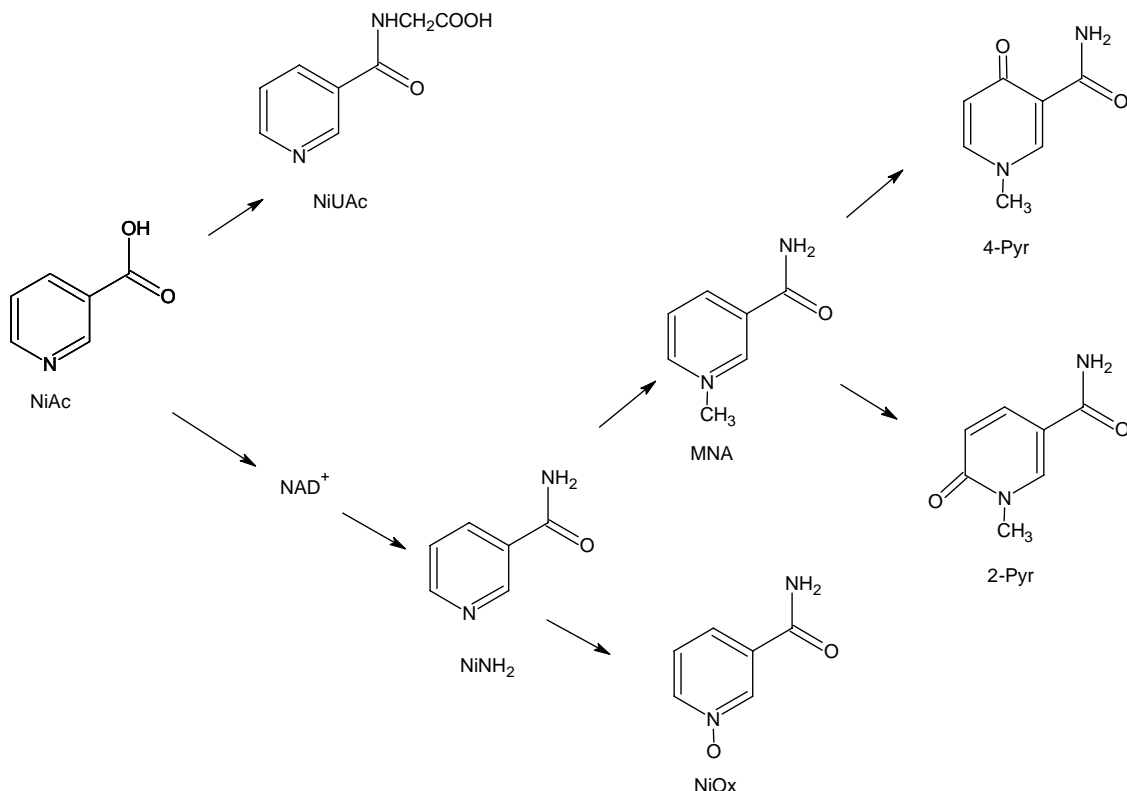
Zum Einen wird Niacin (NiAc) über das Nicotiny Coenzym A zum Glycinkonjugat, die Nikotinursäure metabolisiert.

Zum Anderen wird Niacin zunächst zum Niacinamid (NiNH₂) metabolisiert, welches dann entweder zum Nicotinamid-N-Oxid (NiOx) oxidiert oder zum N-Methyl-Nicotinamid (MNA) methyliert wird.

Das N-Methyl-Nicotinamid (MNA) wird anschließend entweder zum N-Methyl-4-Pyridon-3-Carboxamid (4-Pyr) oder zum N-Methyl-2-Pyridon-3-Carboxamid (2-Pyr) weiter metabolisiert.

Die entstehenden Pyridone werden als Endprodukte des Niacin- und Niacinamid-Metabolismus in Säugetieren angesehen.

Abbildung 1 Metabolisierung von Niacin [46]



Betrachtet man sich diese verschiedenen Verbindungen, so fällt auf, dass es sich hiermit um Moleküle mit zum Teil sehr verschiedenen physikochemischen Eigenschaften handelt.

So liegen unter anderem mit Nikotinsäure und Nikotinursäure saure Verbindungen, mit Niacinamid und N-Methylnikotinamid Basen und schließlich mit Nicotinamid-N-Oxid und den beiden Pyridonen neutral reagierende Verbindungen vor.

Diese Tatsache sowie die starken Unterschiede in der Polarität der Moleküle erschweren die Analytik aus biologischen Matrices enorm, was sowohl Aufreinigung der Probe als auch Trennung der Komponenten in einem Simultanschritt betrifft.

Ferner muss erwähnt werden, dass die Substanzen zum Teil sehr unterschiedliche Absorptionsspektren und pK_s Werte besitzen, was zur Folge hat, dass bei photometrischer Detektion die Empfindlichkeit dieser Substanzen mit der Anwesenheit von Elektrolyten oder sich änderndem pH- Wert schwankt [47, 48].

1.1.3. Analytik

Wie bereits beschrieben existieren zahlreiche Untersuchungen über die pharmakologische Wirksamkeit von Niacin innerhalb des Lipidmetabolismus.

Um diese genauer erforschen zu können, wurden inzwischen zahlreiche Bestimmungsmethoden in biologischen Matrices etabliert.

Daher soll an dieser Stelle ein Überblick über diese Methoden mit kurzer Diskussion gegeben werden.

Zu Beginn wurden zunächst zahlreiche Bestimmungsverfahren getestet.

Mikrobiologische Methoden waren einigermaßen empfindlich aber nicht ausreichend selektiv [49,50].

Kolorimetrische Methoden basierend auf der König Reaktion wurden durch Interaktionen der Metaboliten beeinträchtigt und waren ausserdem nicht sehr empfindlich [51,52].

Papierchromatographie [44], Dünnschichtchromatographie [53], Flüssigchromatographie [45] ebenso wie GC gestalteten sich zu zweitaufwendig für die Routineanalytik, da die Bestimmung hier nur über Derivatisierungen möglich war [30, 54].

Aus diesen Gründen kristallisierten sich dann in den letzten 20 Jahren zahlreiche HPLC Methoden als vorherrschende Bestimmungstechnik heraus, da es damit möglich war, Niacin und einige seiner Metaboliten simultan und nach relativ einfacher Probenaufarbeitung zu bestimmen.

In jüngster Zeit kamen kapillarelektrophoretische (CE) Methoden hinzu, welche eine attraktive Technik zur Bestimmung von Wirkstoffen in biologischen Matrices darstellen können, da sie zum Teil ohne jegliche Probenaufarbeitung auskommen und sich ferner mit ihnen Substanzen mit sehr unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften simultan bestimmen lassen. Was die Analytik von Niacin und seinen Metaboliten betrifft, konnte erst nach aufwendiger Probenaufarbeitung eine Bestimmungsgrenze von 1 µg/mL und dies nur für Niacin erreicht werden [26,29].

Daher sind CE Methoden im Augenblick noch ungeeignet zur Bestimmung von endogenen Spiegeln von Niacin [15,16] aber durchaus schon nützlich in der Routineanalytik zur Überwachung der Blutspiegel beim Einsatz von Niacin zur Behandlung von Hyperlipidämie.

Beim Einsatz der HPLC Methoden ergaben sich immer wieder Schwierigkeiten, da Niacin und seine Metaboliten, wie bereits mehrfach erwähnt, stark unterschiedliche physikochemische Eigenschaften besitzen.

Sowohl die unterschiedlichen pK_s Werte als auch die hydrophilen bzw. -phoben Eigenschaften erschweren eine Simultanbestimmung mittels HPLC in einem einzigen Trennungsschritt.

Darüberhinaus wird die Chromatographie an Umkehrphasen durch 2 Dinge sehr erschwert:

Niacin und seine Metaboliten enthalten mindestens ein Stickstoffatom im Molekülbau, welches oft starkes Tailing verursacht. Ferner ist die hohe Wasserlöslichkeit der Komponenten der Grund dafür, dass sie sehr schnell, oft schon mit der Totzeit des chromatographischen Systems, eluieren. Aus diesen Gründen wurde zumeist die Ionenpaartechnik angewandt. Ein beliebtes Ionenpaarreagens ist u.a. die Heptansulfonsäure [55,56].

Allgemeines und Aufgabenstellung

Sehr schwierig ist es auch Niacin und seine analogen Abkömmlinge mittels eines isokratischen HPLC Laufs zu trennen. In der Regel muss Gradientenelution angewandt werden, was in der Routineanalytik lange Analysezeiten zur Folge hat.

In der Literatur ist eine Methode beschrieben, mit der mittels eines linearen Gradienten alle 7 Verbindungen mit ausreichender Trennung chromatographiert werden konnten [23], jedoch wurde bereits gezeigt, dass diese Methode ungeeignet zur quantitativen Bestimmung in biologischen Matrices aufgrund zahlreicher Störpeaks ist [22].

Folgende Tabelle gibt nun einen Überblick welche niedrigsten Bestimmungsgrenzen mittels HPLC mit UV Detektion in Plasma bislang erreicht werden konnten.

Tabelle 1 Bestimmungsgrenzen in Plasma mittels HPLC-UV

Analyt(en)	Probenvorbehandlung	Bestimmungsgrenze	Referenz
NA	Proteinfällung mit Aceton	0.100 µg/mL	[26]
NA	Proteinfällung mit Aceton, anschliessend Derivatisierung zu einem fluoreszierenden Ester	20.0 ng/mL	[21]
NA, NUR	Proteinfällung mit Aceton, anschliessend Waschen mit Chloroform	0.100 µg/mL (NA) 0.500 µg/mL (NUR)	[18]
NA, NAM, NUR	Proteinfällung mit Aceton, anschliessend Waschen mit Chloroform	0.500 µg/mL (NA, NUR) 1.00 µg/mL (NAM)	[20]
NA, NAM, NUR	Festphasenextraktion	50 ng/mL für alle Analyten	[25]

NA=Nikotinsäure; NAM=Nikotinamid; NUR=Nikotinursäure

Die Nachteile der beschriebenen Methoden sind :

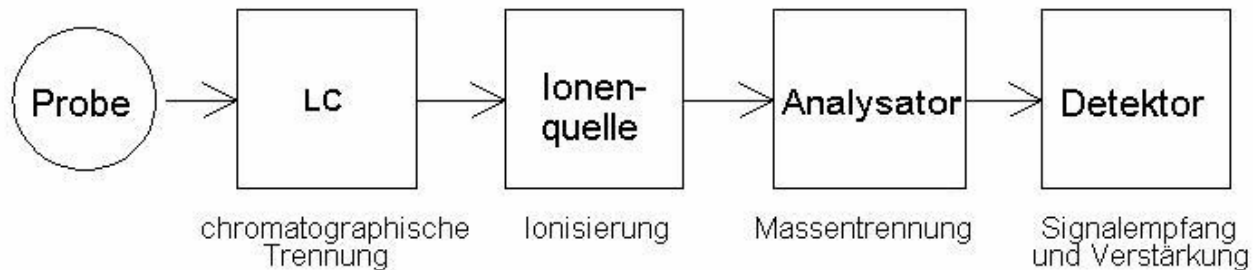
- [26,21,18] keine Simultanbestimmung von Niacin und den beiden Hauptmetaboliten
- [20] relativ hohe Nachweisgrenzen der Analyten
- [25] extrem lange Zeitdauer (40 Minuten) von Injektion zu Injektion, da die Laufzeit 25 Minuten beträgt und zwischen den Läufen weitere 15 Minuten Spül- und Konditionierzeit benötigt werden.

Zusammenfassend ist an den vorangegangenen Darstellungen zu sehen, dass die Notwendigkeit bestand, eine Bestimmungsmethode mittels LC-MS für Niacin und seine Metaboliten zu entwickeln, die geeignet ist, Proben zu messen, die aus pharmakologischen oder pharmakokinetischen Studien gewonnen werden.

LC-MS bietet hierzu die Möglichkeit, quantitative Bestimmungen sensitiver, selektiver, mit geringerem Aufwand an Probenvorbereitung und mit höherem Probenumsatz durchzuführen als die bisher gezeigten Methoden. Da man von extrem niedrigen Plasmaspiegeln der übrigen Metaboliten ausgeht [46], hat man sich in der vorliegenden Arbeit auf die Bestimmung von Niacin sowie den beiden Hauptmetaboliten Niacinamid und Nikotinursäure beschränkt.

1.2. LC-MS – Allgemeines

Abbildung 2 zeigt den schematischen Aufbau eines LC-MS Systems :



In den nun folgenden Kapiteln werden die Einzelelemente eines LC-MS Systems etwas näher erläutert.

1.2.1. HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Chromatographie - dieser Begriff steht heute für eine große Zahl von Trennmethode, die obwohl äußerlich sehr verschieden, alle auf dem gleichen Prinzip beruhen :

Chromatographie ist die multiplikative Verteilung eines Stoffes zwischen zwei relativ zueinander bewegten Phasen, einer mobilen und einer stationären Phase. Die verschiedenen Chromatographiearten unterscheiden sich durch die Beschaffenheit von stationärer und mobiler Phase.

Die in einer mobilen Phase gelösten Substanzen erleiden beim Durchströmen der stationären Phase charakteristische Retentionen (von lat.: zurückhalten, verzögern) und werden dadurch voneinander getrennt. Um diesen Retentionsunterschied hervorzuheben, muß das Trennphasensystem für verschiedene Substanzen eine gewisse Selektivität besitzen. Dabei kann es sich um eine Wegdifferenz im Trennbett, wie im Falle der Dünnschichtchromatographie (innere Chromatogramme), oder aber um eine Zeitdifferenz am Ende des Trennbetts, wie bei der Gaschromatographie oder bei der HPLC (äußere Chromatogramme) handeln.

Den Namen „Chromatographie“ (von griech.: Farbe) hatte der russische Botaniker Tswett bereits 1905 einem Trennverfahren gegeben, mit dem er Blattfarbstoffe an einer mit Calciumcarbonat gefüllten Säule in ihre Bestandteile zerlegen konnte.

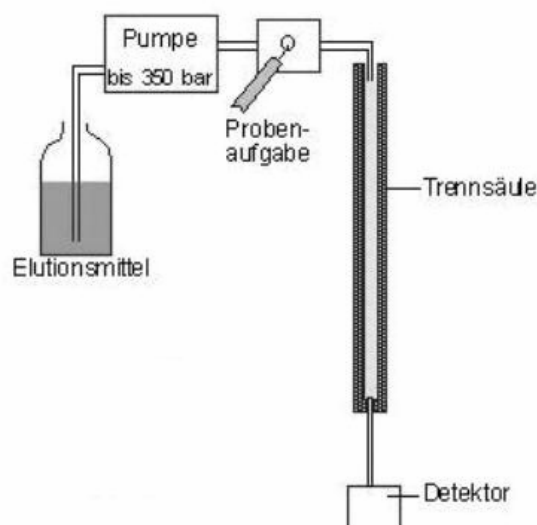
Selbstverständlich hat diese Entdeckung heute nur noch historische Bedeutung.

Die Grundsteine für die heutige Anwendung der HPLC als Trennmethode wurden um etwa 1965 gelegt, als man begann die mit Hilfe der Gaschromatographie gewonnenen theoretischen Erkenntnisse über die Grundlagen des chromatographischen Trennprozesses zur Verbesserung säulenchromatographischer Trennungen mit flüssiger mobiler Phase auszunutzen. Ferner trug dazu die Entwicklung standardisierter Sorbentien (zumeist Kieselgele und Aluminiumoxid) bei. So entwickelte sich mit der Zeit die HPLC zu einem leistungsfähigen, flexiblen, präzisen und kostengünstigen Trenn- und Analysenverfahren, das der Gaschromatographie in mancher Hinsicht überlegen ist.

Die wesentlichen Veränderungen gegenüber der normalen Säulenchromatographie sind

- der Einsatz von Sorbentien geringerer Teilchengrösse (heute übliche Korngrößen sind 3-5 μm) zur Herabsetzung der Diffusionswege und zur Beschleunigung des Stoffaustausches
- die Anwendung von Hochdruck (bis zu 350 bar) zur Beschleunigung des Durchsatzes der mobilen Phase

Abbildung 3 Aufbau einer HPLC-Anlage



Über eine vorgeschaltete Pumpe und ein Injektionssystem wird nun die zu untersuchende Substanz bzw. das Substanzgemisch auf die Trennsäule aufgebracht und mit der mobilen Phase mitgeführt. Dabei erfolgt auf der festgelegten Trennstrecke des Laufmittels die multiplikative Verteilung zwischen den beiden Phasen. Die unterschiedliche Affinität der zu trennenden Substanzen gegenüber der einen oder anderen Phase gründet sich im wesentlichen auf folgende molekulare Wechselwirkungen:

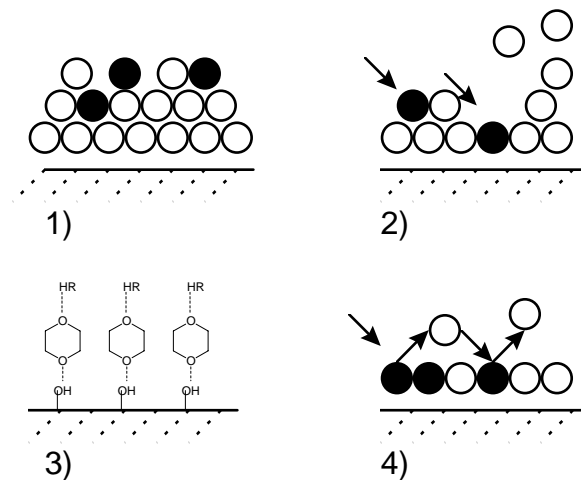
- Dispersionskräfte : London-, Van der Waalskräfte (wesentlich bei unpolaren Molekülen)
- Dipolinduzierte Kräfte : Debye-Kraft aufgrund unterschiedlicher Polarisierbarkeit
- Dipol - Dipol Wechselwirkungen
- Wasserstoffbrückenbindungen
- ionische Beziehungen
- koordinative Bindungen

Dabei unterscheidet man folgende Trennmechanismen in der Reihenfolge ihrer Bedeutung:

a) Adsorption

Sie ist das am meisten genutzte Trennprinzip. Es beruht auf der Wechselwirkung der Substanzen mit der Oberfläche des Sorbens. Eine unspezifische Adsorption findet an unpolaren Oberflächen statt. Diese sind energetisch weitgehend homogen. Für die spezifische Adsorption existieren folgende Modelle :

Abbildung 4 Retentionsmodelle (nach Frey/Zieloff [57])



- 1) die mobile Phase bildet auf der Oberfläche Mehrschichten, in denen sich die Substanzen unterschiedlich lösen [58].
- 2) die polaren Bestandteile der mobilen Phase bilden Einfach- und Zweifachschichten. Die Retentionen der Substanzen erfolgt unter Verdrängung der Moleküle aus der zweiten Schicht. Nur für sehr polare Moleküle wird eine direkte Wechselwirkung mit der Sorbensoberfläche angenommen [59].
- 3) bifunktionelle Laufmittel, wie z.B. Dioxan, gleichzeitig mit dem Sorbens und mit der Substanz(HR) als sogenannte „Haftvermittler“ (Co-Adsorption) eine Wechselwirkung aus [60].
- 4) die stationäre Phase wird vom Sorbens mit einer Monoschicht mobiler Phase gebildet. Die Adsorption der Substanzen erfolgt unter Verdrängung eines äquivalenten Volumens dieser Schicht. Eine inter- und intramolekulare Wechselwirkung von Substanz- und Solvensmolekülen wird nicht in Betracht gezogen. Dies ist das sogenannte „Verdrängungsmodell“ [61,62].

b) Lösungsverteilung

Dieses Trennprinzip beruht auf der unterschiedlichen Löslichkeit der Substanzen in der mobilen Phase und einer stationären Flüssigphase. Letztere bildet einen dünnen Film auf einer inerten Stützphase.

c) Trennungen an Umkehrphasen (reversed phase, RP)

An Umkehrphasen, d.h. hydrophoben stationären Phasen (z.B. Kieselgelschichten, die durch Umsetzung mit Halogenalkylsilanen definierter Kettenlänge -C8 oder C18-hydrophobiert werden), kommen als Molekülwechselwirkungen nur Dispersionskräfte in Frage. Dafür wird das Fließmittel umso polarer gewählt. Der Retentionsmechanismus kann mit dem Solvophobie-Konzept von Horvath beschrieben werden [63,64]:

Wird ein Molekül in einem Solvens gelöst, so muß es dessen Struktur lokal zerstören, um in einem „Loch“ Platz zu finden. Die Energie, die dabei aufzubringen ist, ist die „Lochbildungsarbeit“ .

- das Solvens versucht nun, die Fremdsubstanz aufgrund seiner Oberflächenspannung aus dem Flüssigkeitsverband herauszudrängen, und zwar umso stärker, je hydrophober die Fremdsubstanz ist.
- durch unspezifische Wechselwirkung mit der stationären Phase verringert sich die Gesamtoberfläche der verdrängten Moleküle. Der hieraus resultierende Energiegewinn (Ursache : Mischungs- und Konfigurationsentropie [65]) ist verantwortlich für die Retention

d) Weniger bedeutende Trennprinzipien in der Flüssigchromatographie sind :

- Ionenpaarbildung
- Ionenaustausch
- Ausschlußprinzip (Permeation)
- Komplexbildung (Donor-Akzeptor-Wechselwirkungen)
- Trennung an chiralen Phasen

Die Maßzahl, die das Ergebnis der Trennung in der HPLC beschreibt ist die Retentionszeit :

Gleichung 1 Berechnung der Retentionszeit

$$t_R = t'_R + t_0$$

t_R : Bruttoretentionszeit

t'_R : Nettoretentionszeit

t_0 : Totzeit

und der k' - Wert (Retentionsfaktor)

Gleichung 2 Berechnung des k' - Wertes

$$k' = (t_R - t_0) / t_0$$

Um diese Werte zu erhalten ist es vonnöten am Ende der Säule geeignete Detektoren zu verwenden. Übliche Detektoren in der HPLC sind der UV/VIS Detektor und der Massenselektive Detektor (MSD) :

1.2.2. LC-Tandem Massenspektrometrie in der Bioanalytik

Die Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) stellt schon geraume Zeit eine hochspezifische Methodik zur Quantifizierung thermostabiler, niedermolekularer Substanzen dar. Das Anwendungsspektrum dieser Technik ist jedoch durch zahlreiche Faktoren begrenzt (u.a. ausreichende Flüchtigkeit und Ionisierbarkeit der Analyten, Derivatisierungsmöglichkeiten, hohe Anforderung an Reinheit der Extrakte). Eine bahnbrechende Entwicklung der klinisch-chemischen Analytik der vergangenen Jahre stellt die Kopplung der Flüssigkeitschromatographie mit der Massenspektrometrie dar (LC-MS), die eine weitaus vielseitigere Anwendung der Massenspektrometrie in der medizinischen Analytik erlaubt.

Möglich wurde die Kopplung LC-MS durch die Konstruktion immer leistungsfähigerer Vakuumpumpen (Vor- und Turbopumpen), die es ermöglichen das Vakuum im Inneren des Massenspektrometers trotz ständig einströmender Teilchen aufrechtzuerhalten.

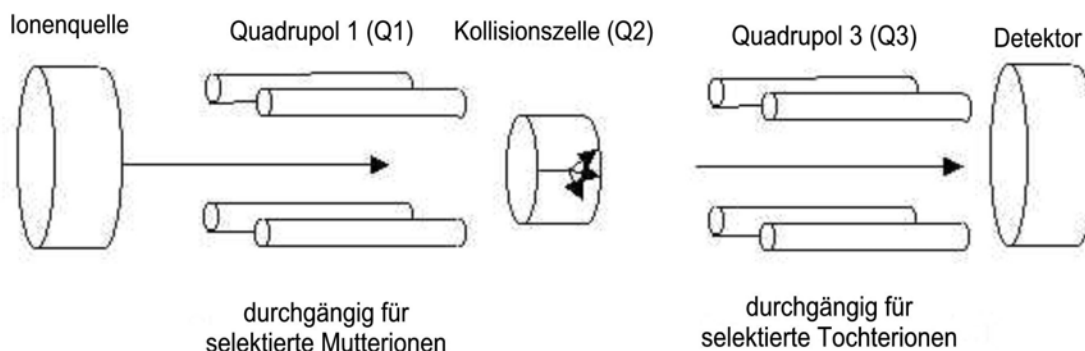
Bei der LC-MS erfolgt die Ionisation der Analytmoleküle bei Atmosphärendruck und Umgebungstemperatur; im Gegensatz zur GC-MS erlaubt die LC-MS die Ionisation der großen Mehrzahl medizinisch relevanter Analyten ohne thermische Belastung und ohne vorherige Derivatisierung. Um die begrenzte Trennleistung der Flüssigkeitschromatographie gegenüber der Gaschromatographie zu kompensieren, wurden Gerätesysteme entwickelt, bei denen zwei Massenspektrometer gekoppelt arbeiten mit einer zwischengeschalteten Kollisionszelle. Das Arbeitsprinzip dieser LC-Tandem MS Systeme (syn. Triple-stage LC-MS oder LC-MS/MS) lässt sich wie folgt beschreiben:

Nach Auftrennung der Probe mittels LC erfolgt die Ionisation.

Der Ionenstrom wird in einen Hochvakuumbereich hineinbeschleunigt. Im ersten Quadrupol-Massenspektrometer, einer Parallelanordnung von vier Metallstäben, wird durch ein angelegtes Radiofrequenzmuster erreicht, daß nur Ionen eines ausgewählten Molekülgewichts passieren.

In der Kollisionszelle strömt ein minimaler Fluß von Kollisionsgas in das Hochvakuum ein, wodurch die selektierten Ionen durch Kollision fragmentiert werden. Hierbei entsteht eine Reihe charakteristischer Fragmentionen (Tochterionen). Im zweiten Massenspektrometer wird nun ein durch die Masse definiertes Fragment des Analytmoleküls selektiert; dieser Ionenstrom schlägt schließlich in einer Detektormembran Elektronen frei, die einen Strom als Meßsignal erzeugen. Die Anordnung zweier Massenspektrometer erlaubt die höchst spezifische Detektion von Analytmolekülen, sowohl was Selektivität als auch Signal-Rausch Verhältnis betrifft. Hierdurch wird die Anforderung an die Probenvorbereitung und die vorgeschaltete Chromatographie zumeist minimiert.

Abbildung 5 Schema eines Tandem-Massenspektrometers



1.2.3. Ionisierungsarten in der LC-MS

Die bekanntesten Ionisierungsarten sind :

1.2.3.1. Elektrospray – Ionisation (ESI)

Der Begriff basiert auf Arbeiten von Dole [66] und wurde letztendlich durch Fenn (Nobelpreis für Chemie 2002) [67,68] etabliert.

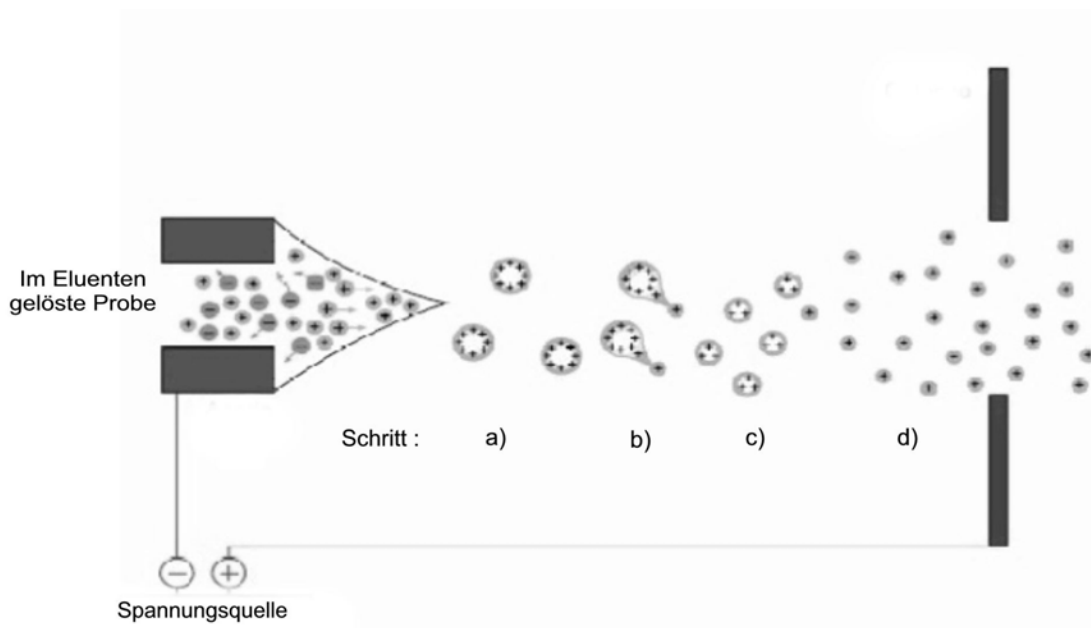
Der Sprayprozess in der Ionenquelle findet unter Atmosphärendruck statt. Die Probenlösung wird von der Pumpe über einen Kapillarschlauch, der in eine Metallkapillare mündet, zugeführt. Diese wird auf eine Potentialdifferenz von ca. 3-8 kV bezogen auf den Eingangskonus des Massenspektrometers gelegt.

Aufgrund des hydrodynamischen Sprühvorgangs, der durch die Potentialdifferenz ausgelöst wird, werden sehr kleine, geladene Lösungsmitteltropfen erzeugt, aus denen nach Verdampfen des Lösungsmittels Ionen zurückbleiben, die dann in das Massenspektrometer fokussiert werden. Auf diese Weise erfolgt die Ionenbildung bei Atmosphärendruck direkt aus der Lösung ohne einen zusätzlichen Verdampfungsschritt. Die Desolvatation kann dabei zusätzlich durch Erhitzen und das Formen eines regelmäßigen Sprays durch zusätzliches Zerstäuben mittels eines Inertgases (zumeist Stickstoff) unterstützt werden.

Der ESI Prozess kann demnach formal in 4 Schritte eingeteilt werden

- a) Dispersion der Probenlösung, Bildung elektrisch geladener Tröpfchen
- b) Zunahme der Oberflächenladung der Tröpfchen durch kontinuierliches Verdampfen des Lösungsmittels
- c) wiederholter, spontaner Zerfall der Tröpfchen in Mikrotröpfchen infolge Coulomb-Explosionen (Zerfall der Tröpfchen aufgrund hoher Ladungsdichte)
- d) Transport und Desolvatisierung der Ionen von dem unter Atmosphärendruck stehenden Ionisationsbereich in den Vakuumbereich des Massenspektrometers

Abbildung 6 Schema des ESI-Prozesses



Aufgrund der obengenannten Tatsachen beruht die Chromatographie für LC-MS Analysen fast ausschließlich auf RP-Chromatographie, da hier mit überwiegend polaren Fließmitteln gearbeitet wird, die die Ionisierung der Analyten infolge besserer Ladungsübertragung begünstigen.

Weiterhin kann der Ionisierungsprozess durch Zugabe von flüchtigen Verbindungen unterstützt werden, indem sie ebenso die Ladungsübertragung begünstigen.

Übliche Zusätze in der LC-MS zum Fließmittel sind z.B. Ameisensäure, Essigsäure oder Trifluoressigsäure; als Puffersysteme eignen sich Ammoniumformiat- oder Ammoniumacetatpuffer.

1.2.3.2. Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)

Die APCI ist eng verwandt mit der chemischen Ionisation (CI), läuft unter Atmosphärendruck ab (wie ESI) ist aber weniger schonend als ESI (d.h. es treten vermehrt Fragmentationen auf).

Schema:

- Der gelöste Analyt wird durch eine Kapillare zerstäubt, wobei ein Spray entsteht
- das Spray wird durch eine beheizte Keramik (300-400°C) geführt, wo das Lösungsmittel vollständig verdampft wird
- der Lösungsmittel-/Analyt-Dampf wird über eine Corona-Entladungsnadel geführt, wobei Lösungsmittelmoleküle ionisiert werden
- die ionisierten Lösungsmittelmoleküle wiederum ionisieren die Analytmoleküle, die dann ins Vakuum überführt werden

Wann verwendet man APCI?

- Der Analyt ist mit ESI schlecht ionisierbar (z.B. wenig funktionelle Gruppen, kein Stickstoff)
- Der Analyt enthält nur "nicht-saure" oder "nicht-basische" funktionelle Gruppen (z.B. Kohlenwasserstoffe, Alkohole, Aldehyde, Ketone, Ester)
- Die Probe ist thermisch stabil und verdampfbar
- APCI kann bisweilen helfen die Linearität der Kalibrierung zu verbessern falls über einen weiten Konzentrationsbereich gemessen werden soll, da die Ionisierung später als bei ESI erfolgt und sie insofern weniger von Faktoren wie z.B. Tröpfchengröße abhängt.
- Flußraten, Lösungsmittel oder Zusätze sind nicht mit ESI kompatibel

1.2.4. Ionensuppression

Dieser Begriff wird im Zuge der späteren Darstellung der Methodenentwicklung zur Bestimmung von Niacin und seinen Metaboliten eine große Rolle spielen und sei daher an dieser Stelle kurz erläutert :

Ionensuppression in der LC-MS kann auftreten, wenn eine coeluierende Fremdschubstanz die Ionisierung des oder der Analyten in der Ionenquelle unterdrückt.

Veränderungen der Tröpfcheneigenschaften in Gegenwart höher konzentrierter, weniger flüchtiger Substanzen (z.B. Sulfate, Phosphate, mitgefällter Analyt, leichter ionisierbare Störkomponenten) verursachen die meisten Ionensuppressionen bei der Bestimmung aus biologischen Matrices im ESI-Modus.

Es wurde bereits beobachtet, dass das Ausmass an Ionensuppression im ESI-Modus weitaus höher ist als das im APCI Modus [69].

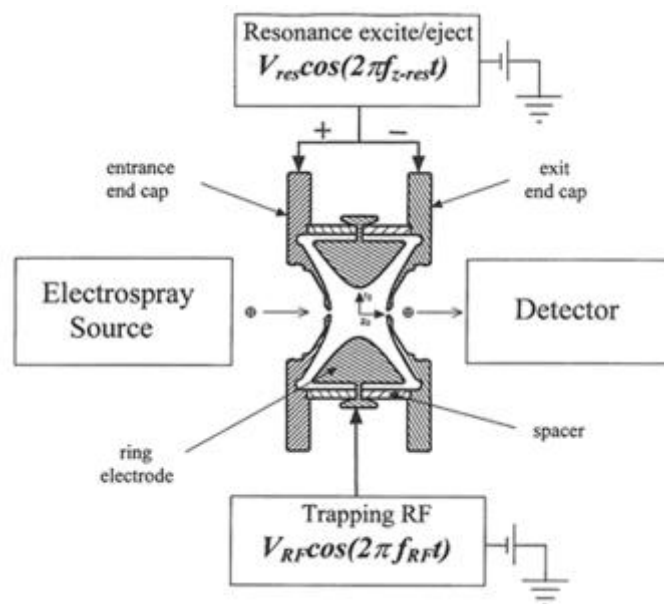
Dieser Effekt der Ionensuppression kann dann zu folgenden Problemen führen :

- Schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse
- Schlechte Genauigkeit der Ergebnisse
- Schlechte Bestimmungsgrenze

1.2.5. Massenspektrometrie mittels der Ion-Trap Technik

Ion-Trap MS ist eine Alternative zur bereits erwähnten Quadrupol Technik. Ihre Funktionsweise soll nun im folgenden kurz erläutert werden.

Abbildung 7 Schema der Ion Trap [70]



Anfang der fünfziger Jahre fand W. Paul heraus, daß sich das oszillierende elektrische Quadrupolfeld als Speicher für Ionen benutzen lässt [71]. Auf ein geladenes Teilchen wird durch Wechselfelder eine Kraft ausgeübt, die im zeitlichen Mittel auf den Mittelpunkt der Elektrodenanordnung gerichtet ist. Die Ionenfalle wurde von W. Paul 1953 vorgeschlagen, 1989 erhielt er u. a. dafür den Nobelpreis. Seine Erfindung findet heute Anwendung als Massenspektrometer sowie als Speicher für geladene Teilchen von Ionen bis hin zu makroskopischen Partikeln.

Das Prinzip der Ionenfalle (Ion-Trap) beruht auf dem Einfangen von Ionen in einem geeigneten elektrischen Feld.

Die Ionenfalle besteht aus einer Ringelektrode mit zwei Endkappen, an die Wechselspannungen angelegt werden. In der Mitte der Kappen befinden sich Öffnungen zum Einlass und Auswurf der Ionen.

Durch die Kombination von Gleich- und Wechselspannung können in diesem Spannungsfeld Ionen gefangen werden, d.h. sie bewegen sich innerhalb des Analysators auf geschlossenen Bahnen, in einem in sich geschlossenen System.

Dies geschieht durch Anlegen der Wechselspannung an die Ringelektrode, wodurch im Inneren eine räumlich ausgedehnte Potentialmulde entsteht. In dieser Mulde werden die Ionen ähnlich wie Murmeln gefangen. Da die meisten Ionen wegen Ihrer Geschwindigkeit über den Rand der Mulde „hinausrollen“ würden, ist die Falle mit Helium gefüllt. Durch die Kollision mit den Heliumatomen werden die Ionen abgebremst. Im Gegensatz zu anderen Analysatoren, bei denen nur Ionen eines eng begrenzten Massenbereichs herausgefiltert werden sollen, werden in der Ionenfalle Ionen eines möglichst breiten Massenbereichs eingefangen und gespeichert. Zur Analyse werden dann durch Spannungsänderungen Ionen mit aufsteigendem Molekulargewicht aus der Falle ausgeworfen.

Bei der elektrischen Ionenfalle handelt es sich um einen günstigen, mit verschiedenen externen Ionenquellen kombinierbaren Analysator.

Sie bietet jedoch nur ein geringes Auflösungsvermögen und lässt nur die Analyse von Massen bis zu 40000 Da zu.

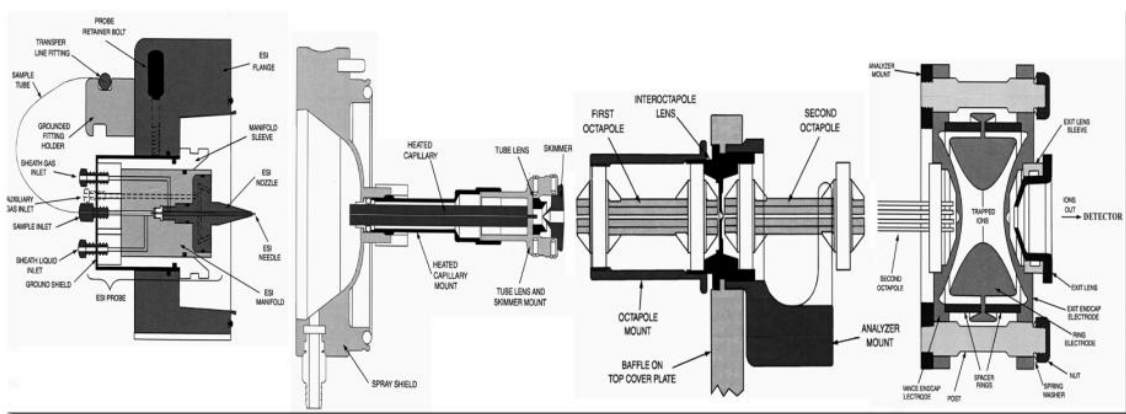
Der grosse Vorteil der Ionenfalle dagegen ist, dass sie die Anwendung multidimensionaler MS erlaubt. Ohne zusätzliche Analysatoren ist es möglich mit ihrer Hilfe MS, MS/MS (= MS^2) , MS^3 ,..... MS^n Analysen durchzuführen :

Dabei werden Ionen durch überlagernde Multipolfelder unter Ausnutzung resonanter Anregungen aus der Ionenfalle selektiv freigesetzt (*Ionen-Cyclotron-Resonanz, ICR*). Ionenfallen können somit auch genutzt werden, um Strukturinformationen über Moleküle zu erhalten. Durch den Einsatz von Heliumgas können Fragmentierungen der Moleküle induziert werden (CID). Zu diesem Zweck wird zuerst ein definiertes Ion in der Ionenfalle isoliert und nach resonanter Anregung der Kollision mit dem Heliumgas unterzogen. Die Fragmente werden schrittweise aus der Ionenfalle entfernt und detektiert. Die verbleibenden Ionen können in einem weiterem MS/MS-Zyklus analysiert werden. Dieses Verfahren wird als MS^n bezeichnet.

Die Messungen in der vorliegenden Arbeit wurden mit einem Finnigan MAT LCQ der Firma ThermoFinnigan [70] durchgeführt.

Zur Ionisierung diente eine ESI –Ionenquelle. Der Ionenstrom wird über eine beheizbare Kapillare und ein Fokussiersystem, bestehend aus einer Tube-Lens, einem Skimmer, zwei Oktapolen und einer Inter-Oktapol Lens in eine Ionenfalle geleitet. Dort erfolgt die Selektion der Ionen und nach Auswurf der selektierten Ionen anschliessend die Detektion am Elektronenvervielfacher.

Abbildung 8 Schema eines LCQ – Ion Trap Massenspektrometers [70]



1.2.6. Extraktionsmethoden in der LC-MS

Wie zuvor schon mehrfach beschrieben, konnte sich die LC-MS mittlerweile als führende Analysetechnik in der Bioanalytik durchsetzen, weil die Anforderungen an die Extrakte bezüglich Reinheit oder auch Derivatisierbarkeit deutlich geringer sind als beispielsweise in der GC-MS.

Im Folgenden soll ein kurzer Überblick gegeben werden welche Extraktionsmethoden für die Analytik von Substanzen aus biologischen Matrices am meisten verwendet werden.

1.2.6.1. Flüssig-Flüssig Verteilung

Hierbei wird die den Analyten enthaltende Matrix mit einem geeigneten Lösemittel ausgeschüttelt, das Lösemittel anschliessend eingeengt, meist im Stickstoffstrom abgedampft und schliesslich in einem anderen zur Injektion in das LC-MS System geeigneten Lösemittel wieder aufgenommen und damit auch zumeist angereichert.

Der Vorteil dieser Methode ist die schnelle und einfache Probenaufarbeitung.

1.2.6.2. Festphasen-Extraktion (SPE)

Die Festphasenextraktion (SPE = solid phase extraction) findet in der Bioanalytik immer dann Anwendung, wenn die zu extrahierenden Substanzen reichlich hydrophil sind, so dass eine Flüssig-Flüssig Verteilung zwischen der zumeist wässrigen Matrix und dem Extraktionsgemisch keine ausreichenden Extraktionsausbeuten liefert, oder wenn besondere Anforderungen an die „Sauberkeit“ der gewonnenen Extrakte bestehen.

Das Prinzip dieser Extraktionsmethode ist nichts anderes als eine Form der Säulenchromatographie. Die zu extrahierende Probe wird auf eine chromatographische Säule (üblich sind Grössen 1 – 3 mL) aufgegeben, anschliessend einem oder mehreren Waschschritten unterworfen, um die Matrix abzutrennen um dann schließlich den oder die Analyten mit einem geeigneten Eluenten wieder von der Säule zu eluieren. Das Eluat kann dann eingeengt und nach Wiederaufnahme mit einem geeigneten Lösemittel ins LC-MS System injiziert werden.

1.2.6.3. Proteinfällung

Die Zugabe bestimmter Reagenzien (z.B. Acetonitril, Methanol, Chloroform, Aceton, Perchlorsäure, Trifluoressigsäure) führt in der Probe zu einer Proteinfällung . Nach Abzentrifugieren des Niederschlags können die Proben mühelos in das LC-MS System injiziert werden.

Der Vorteil dieser Methode liegt in der schnellen Probenaufarbeitung. Nachteile ergeben sich, da trotz Proteinfällung die Proben doch weitestgehend unreiner sind als herkömmlich aufgearbeitete Proben, so dass in der Regel das LC-MS System öfters gereinigt werden muss.

Ferner geht der Anreicherungsprozess verloren, da die Proben nicht weiter eingeeengt werden. Dies bedeutet meist auch einen Empfindlichkeitsverlust.

1.2.6.4. Online- Aufarbeitungsmethoden

Mittlerweile existieren zahlreiche Verfahren, sogenannte Säulenschaltungen, bei denen die manuelle Aufarbeitung zur Gänze entfällt.

Hierbei wird die biologische Probe direkt in ein System injiziert, das zunächst die Probe auf einer Aufarbeitungssäule (zumeist hochpolymere Matrices) reinigt, indem z.B. die Proteinbestandteile mittels eines hohen Flusses der wässrigen Phase des Fliessmittels beseitigt werden. Anschliessend wird durch Umschalten mittels eines Schaltventils die Probe in das MS System gegeben.

Der Vorteil dieser Methode ist die mühelose Probenvorbereitung und der hohe Durchsatz an Proben.

Der Nachteil ist, dass zumeist nur Probenvolumina von ca. maximal 100 µL aufgearbeitet werden können und bei einem ansonsten üblichen Probenvolumen von 1 mL bedeutet dies in der Regel einen vorgegebenen Empfindlichkeitsverlust von ca. Faktor 10.

2. Experimenteller Teil – Methodenentwicklung

Im Folgenden soll nun der Verlauf der Methodenentwicklung aufgezeigt werden, die zur Validierung der Methode zur simultanen Bestimmung von NA, NAM und NUR mittels LC-MS in Plasma führte. Eine detaillierte Beschreibung der letztendlich validierten Methode folgt anschließend in Kapitel 3 „Validierung der bioanalytischen Methode“.

Eine Methodenentwicklung beinhaltet im Einzelnen:

- a) die Erstellung der Massenspektren der beteiligten Komponenten, die
Einrichtung und Optimierung des Massenspektrometers
- b) die Entwicklung einer geeigneten chromatographischen Methode
- c) die Entwicklung einer geeigneten Extraktionsmethode aus der entsprechenden
Matrix
- d) das Auffinden eines passenden Internen Standards zur quantitativen Bestimmung
der Analyten

Wobei ausdrücklich bemerkt werden muss, dass diese beschriebene Reihenfolge nur im Idealfall eingehalten werden kann.

Meist bedingt eine Änderung der analytischen Bedingungen zu einem späteren Zeitpunkt der Methodenentwicklung auch eine notwendige Veränderung bestimmter Parameter, die zu einem früheren Zeitpunkt bereits festgelegt wurden.

Aus diesem Grund wird die Methodenentwicklung zur Bestimmung von Niacin und seiner Metaboliten in Plasma nicht gemäß obiger Auflistung sondern in chronologischer Reihenfolge beschrieben :

2.1. Massenspektren von Nikotinsäure, Nikotinamid und Nikotinursäure

Um die Massenspektren der Analyten zu erhalten, wird eine geeignete Verdünnung (meist 10 ng/μL) der entsprechenden Verbindung direkt über eine Spritzenpumpe kontinuierlich in das LC-MS System eingeführt.

Auf diese Weise erhält man fortwährend das Massenspektrum der Verbindung und ist in der Lage die Bedingungen in der Ionenquelle (ESI oder APCI, positiver oder negativer Ionenmodus) als auch im Trap-System auf optimale Empfindlichkeit und Auflösung einzustellen. Ferner kann daraufhin untersucht werden, ob mehrdimensionale MS möglich ist, was, wie unter Kapitel 1.2.2 beschrieben wurde, von Vorteil in Bezug auf Selektivität und Signal-Rausch Verhältnis sein kann.

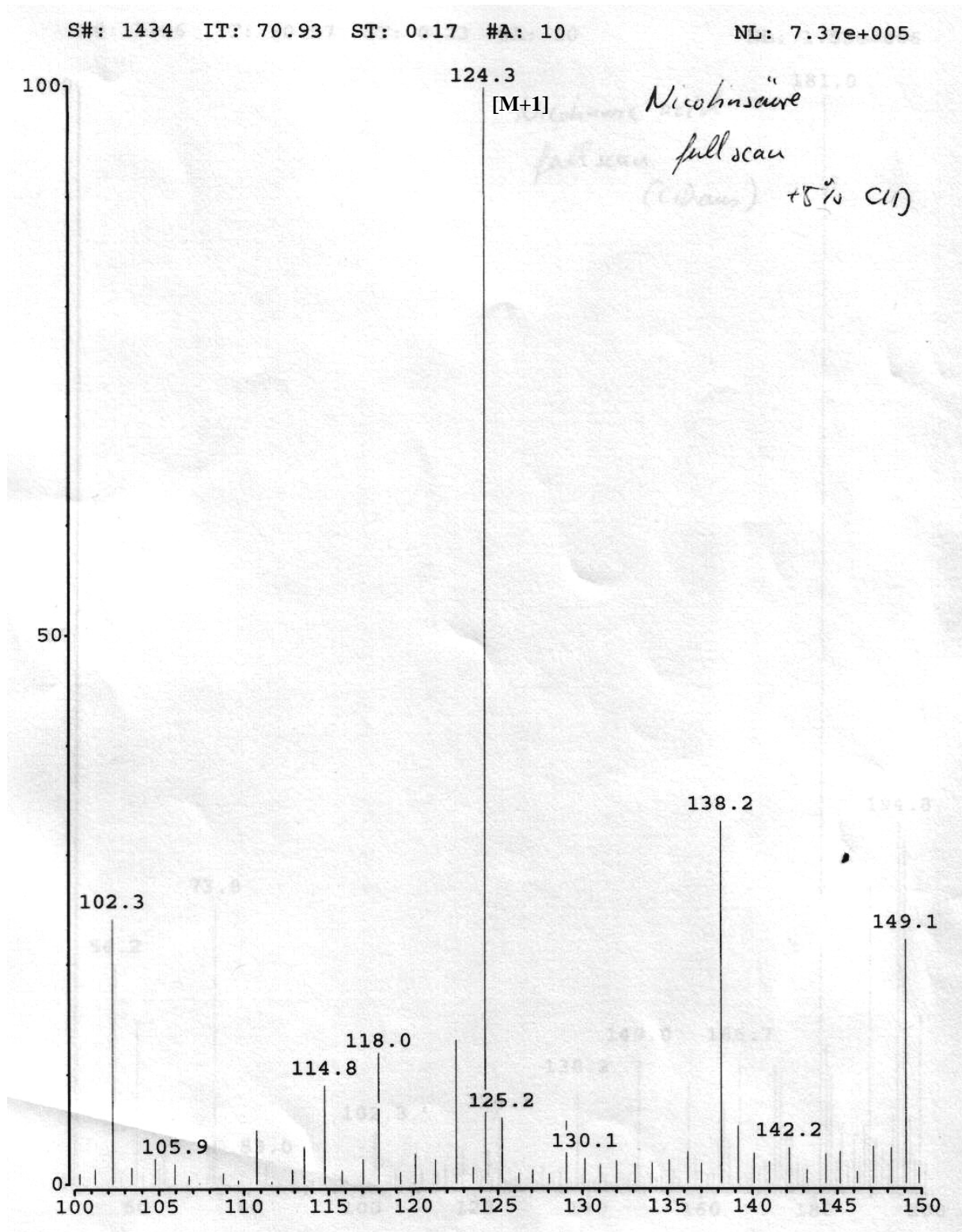
Im Falle von NA und seinen Metaboliten NAM und NUR konnten jedoch nur MS Spektren erhalten werden, was aufgrund der geringen Molekülmasse der Komponenten verständlich erschien.

So wurden beim Einspritzen einer 10 ng/μL Verdünnung der Analyten in Wasser folgende Massenspektren im Full Scan Modus bei Elektrospray Ionisierung (positive Ionen) erhalten :

Experimenteller Teil - Methodenentwicklung

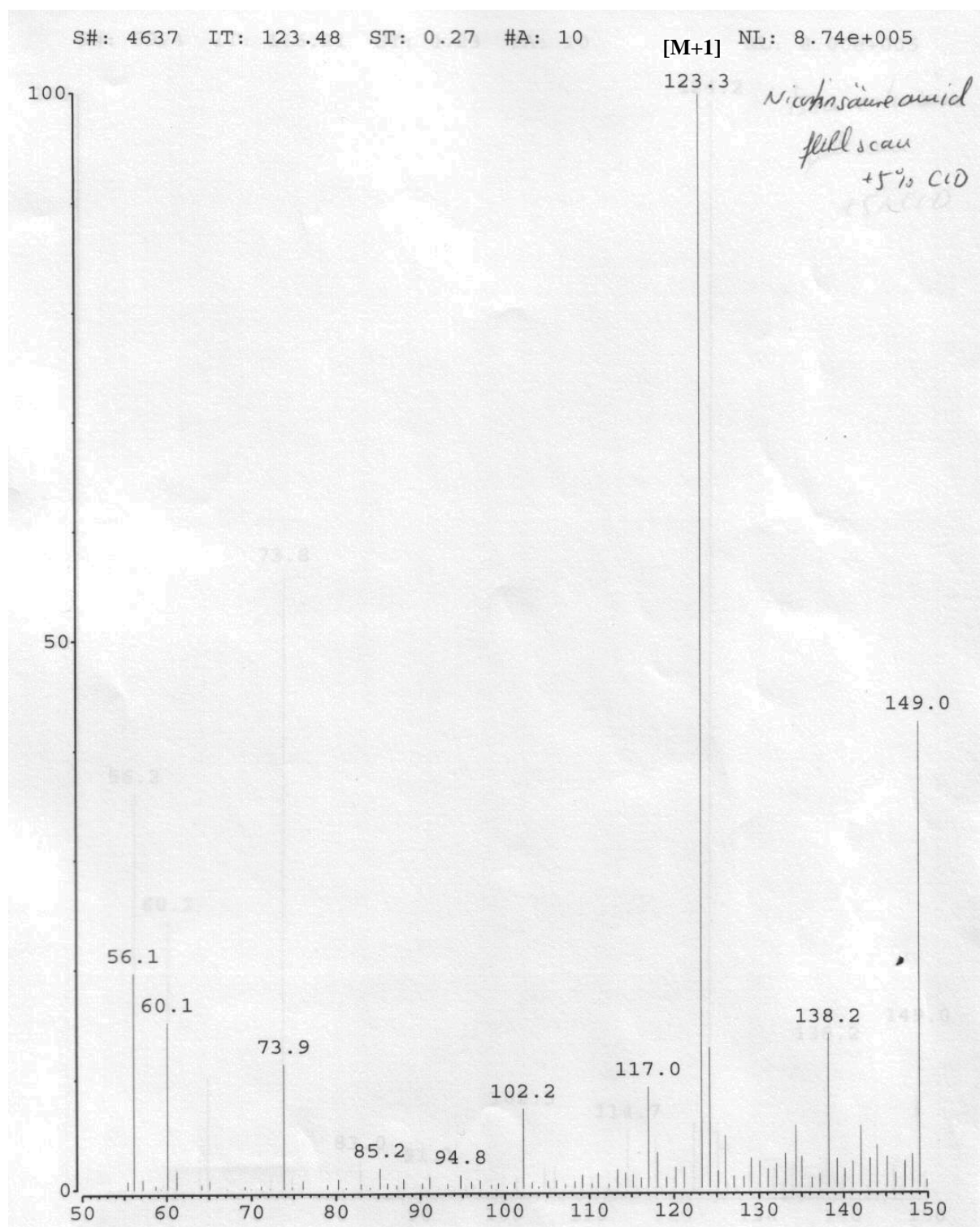
Abbildung 9 Full Scan - MS Spektren von NA, NAM und NUR , ESI, positiver Ionenmodus

Nikotinsäure (NA) : $m/z = 124.3$

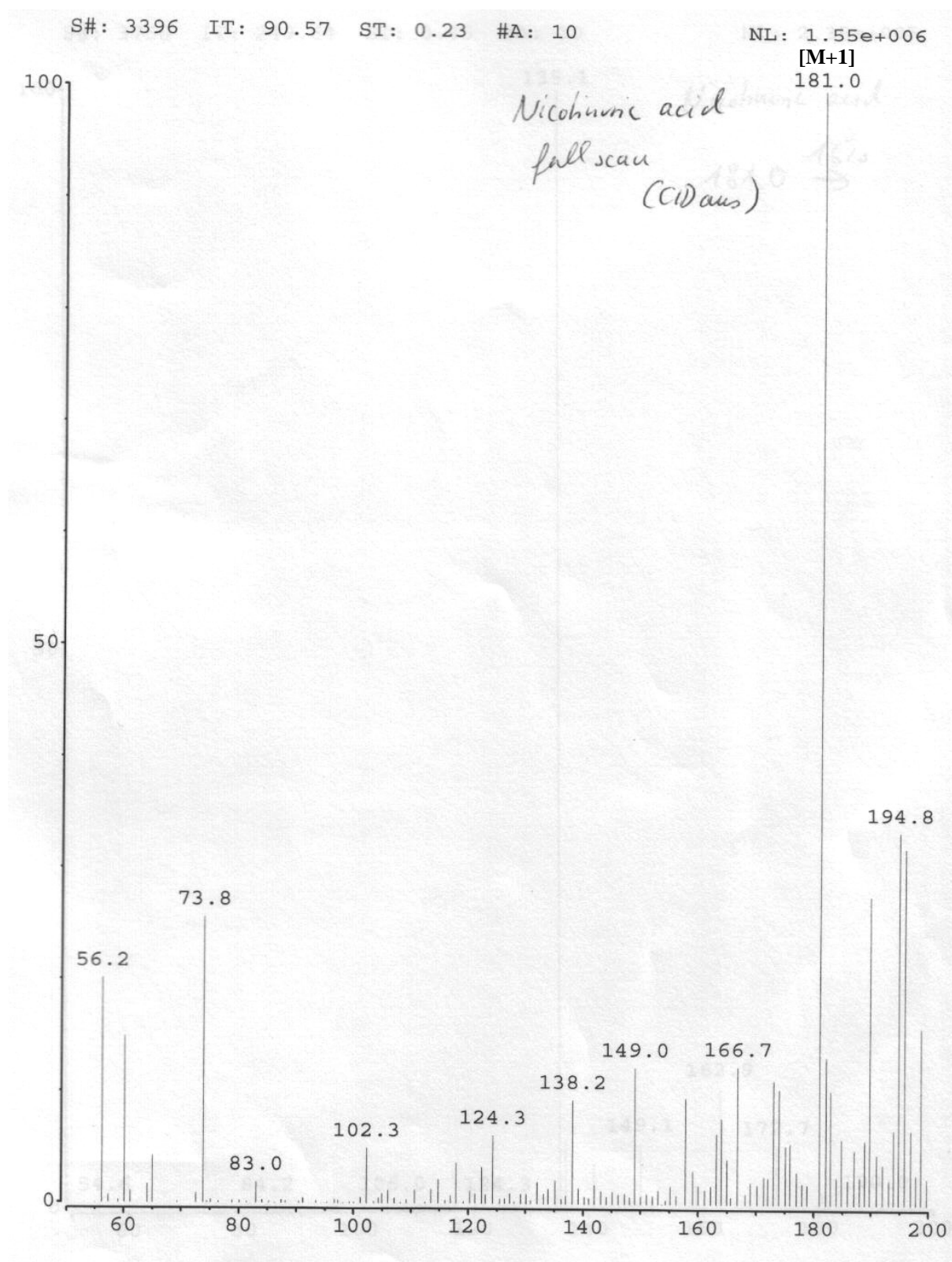


Experimenteller Teil - Methodenentwicklung

Nikotinamid (NAM): $m/z = 123.3$



Nikotinursäure (NUR): $m/z = 181.0$



Zur Förderung der Ionisierung ist der Zusatz von 0.1% Ameisensäure notwendig, was die Bildung protonierter Molekülonen $[M+1]$ begünstigt. Aufgrund der hohen Intensität der Analytmoleküle war eine weitere Optimierung der MS-Parameter nicht erforderlich und es konnte bei den folgenden Experimenten im oben beschriebenen Gerätemodus weitergearbeitet werden.

2.2. Entwicklung der chromatographischen Methode mittels reiner Lösungen

Die Entwicklung einer geeigneten chromatographischen Methode stellte sich von Anfang an als sehr schwierig heraus, da die Analyten durchwegs hohe polare Eigenschaften aufweisen, was es erschwert, eine gute Retention auf Umkehrphasen zu erzielen.

Betrachtet man z.B. die chromatographischen Applikationen einiger HPLC-Säulen-Hersteller von wasserlöslichen Vitaminen, so eluiert Niacin stets als eine der ersten Verbindungen innerhalb dieser Stoffklasse [72].

Bei der bioanalytischen Bestimmung von Substanzen mittels LC-MS versucht man jedoch zu vermeiden, dass man die Analyten allzu nahe an der Totzeit bestimmen muss, da sich in diesem Bereich oft viele Störfaktoren, u.a aufgrund von Ionen-suppression (siehe 1.3.4) ergeben.

Vergleicht man nun die meisten in der Literatur beschriebenen HPLC - Methoden zur Bestimmung von Niacin, wo durchaus annehmbare Retentionszeiten erzielt werden, so ergeben sich folgende Ähnlichkeiten:

- Als stationäre Phase dienen zumeist C18 Phasen, die teils hochquervernetzt sind oder eine hohe Kohlenstoffbelegung aufweisen.
- Als mobile Phase werden in fast allen Fällen gepufferte Systeme verwendet, die für die LC-MS untauglich sind, wie z.B. Phosphatpuffer, da sie sehr schnell die Ionenquelle mit Phosphatsalzen belegen würden.
- In vielen Fällen wird der mobilen Phase ein Ionenpaar-Bildungsreagenz (z.B. Tetra-Butyl-Ammoniumphosphat [73] zugegeben, welches ebenso ungeeignet für Bestimmungen mittels LC-MS ist.

Aus diesem Grund wurde zunächst wegen der hohen Wasserlöslichkeit der Analyten ein Fließmittelgemisch bestehend aus Methanol : 0.1% Ameisensäure = 99 : 1 (v/v) bei einem für die LC-MS üblichen Fluß von 0.2 mL/min getestet.

Bei den ersten chromatographischen Versuchen mit diesem Fließmittel unter Verwendung der reinen Lösungen von Niacin, Niacinamid und Nicotinursäure ergaben die in der Literatur und in den Applikationen der HPLC-Säulen-Hersteller beschriebenen diversen C18 HPLC-Säulen durchwegs einen Retentionsfaktor von $k' = 0$, also keinerlei Retention.

Die C18 Phasen scheinen also ohne Zusätze von Puffersystemen oder Ionenpaarbildungsreagenzien zu schwache Wechselwirkungen mit den Analyten einzugehen.

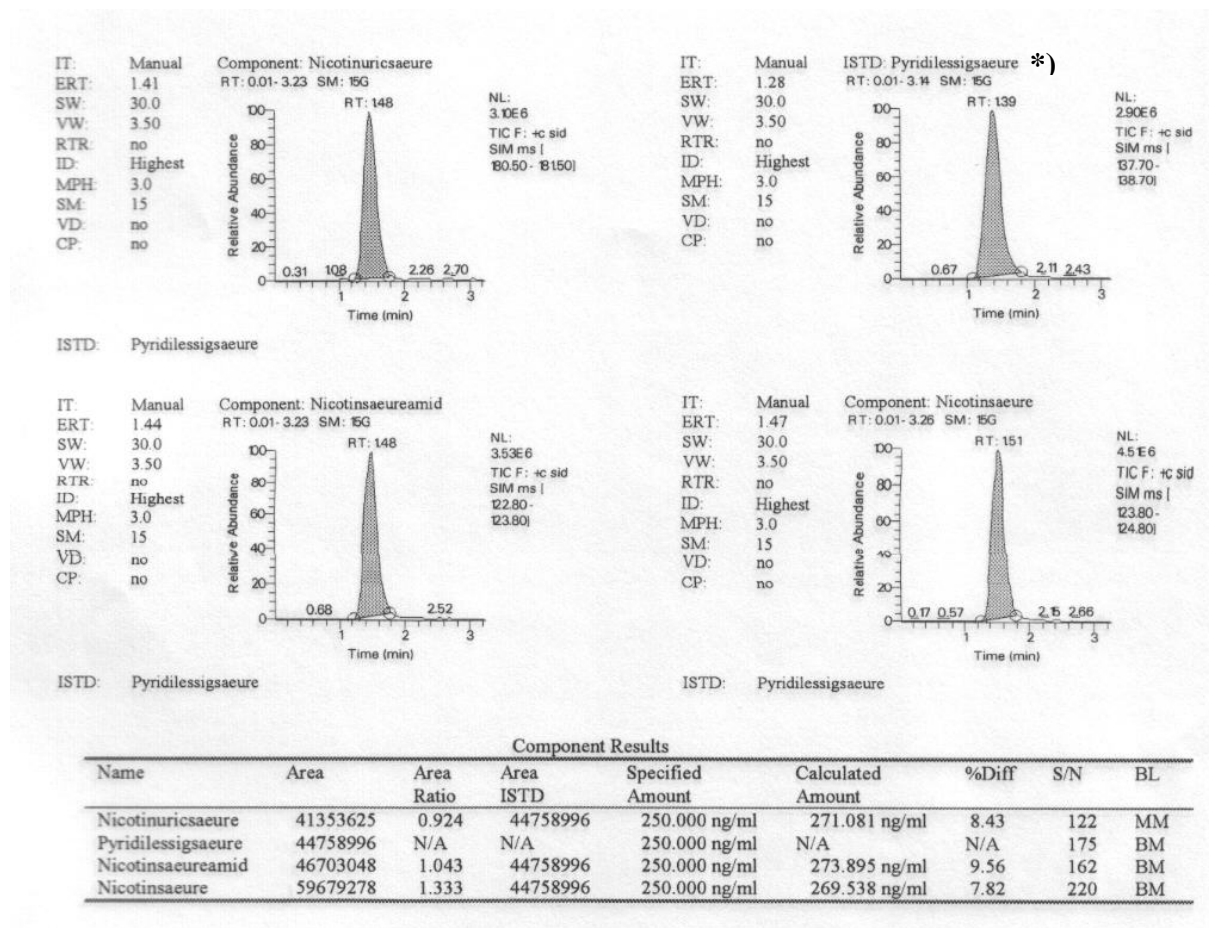
Da es also offenbar erforderlich war, die Polarität der stationären Phase zu erhöhen, wurde daraufhin die folgende HPLC-Säule getestet:

Ultra IBD, 50*2.1 mm, 5µ Korngröße, Hersteller Restek GmbH, 61348 Bad Homburg

Dieses Säulenmaterial enthält eine polare Gruppe, deren Beschaffenheit der Hersteller nicht näher preisgibt, die die Selektivität des C18 Grundgerüsts in Bezug auf Wechselwirkung mit Säuren, Basen, Zwitterionen und weitere polare Gruppen jedoch erheblich erhöht. Wie folgende Chromatogramme zeigen, waren die ersten Resultate zunächst befriedigend.

Experimenteller Teil - Methodenentwicklung

Abbildung 10 SIM Chromatogramm von NA, NAM und NUR, auf Ultra IBD und mobiler Phase MeOH:0.1% HCOOH =99:1



*) Pyridilessigsäure wurde als potentieller interner Standard getestet

Die erzielten Retentionszeiten von ca. 1.5 min entsprechen unter diesen chromatographischen Bedingungen einem Retentionsfaktor von ca. $k' = 2$!

Dies ist für die meisten LC-MS Anwendungen vollkommen ausreichend, so dass mit diesem chromatographischen System zunächst weitergearbeitet wurde !

2.3. Erste Extraktionsversuche von Niacin und dessen Metaboliten aus Humanplasma

Die besondere Herausforderung in der Extraktion von Niacin und dessen Metaboliten aus Plasma liegt unter anderem in der guten Wasserlöslichkeit der Analyten oder anders ausgedrückt: „Wie trennt man etwas sehr Hydrophiles von einer wässrigen Matrix?“

Zunächst wurden alle unter 1.2.6 erwähnten Extraktionsmethoden getestet.

2.3.1. Flüssig-Flüssig Verteilung

Wohl wissend, dass hierbei wahrscheinlich aufgrund der hohen Hydrophilie der Analyten nur geringe Extraktionsausbeuten erzielt werden können, was allerdings bei genügend hoher Reproduzierbarkeit und ausreichender Empfindlichkeit eine untergeordnete Rolle spielt, wurden mehrere Versuche zur Flüssig-Flüssig Verteilung unternommen.

In der Literatur sind einige Experimente zur Flüssig-Flüssig Extraktion beschrieben.

So wird u.a. berichtet, dass NA mit Chloroform und Dichlormethan bei pH 2 und 10 praktisch nicht extrahierbar ist wohingegen sich 47% NAM bei pH 10 extrahieren lassen. Eine Mischung aus Diethylether/Ethanol (83:17, v/v) extrahiert 56% NA bei pH 2 und 65% NAM bei pH 10 [74]. Aus Urin konnte NAM mit Diethylether [42,75,76] und Ethylacetat [77] extrahiert werden.

Vor diesem Hintergrund wurde versucht, Niacin und dessen Metaboliten mit folgenden einigermaßen polaren Lösungsmittel bei verschiedenen pH- Werten aus Plasma zu extrahieren:

- Diethylether
- Diethylether/Ethanol (83:17, v/v)
- Dichlormethan/Ethylacetat
- Ethylacetat
- Butylchlorid
- Gemische aus Hexan/2-Butanol oder Cyclohexan/Diisopropylether

Die Resultate all dieser Versuche waren durchweg vor allem in Bezug auf die Extraktionsausbeute unbefriedigend. Dies konnte unter anderem dadurch belegt werden, dass all diese Versuche auch mit Wasser statt Plasma als Matrix durchgeführt wurden, um bei der anschliessenden Analyse mittels LC-MS den Einfluss von Ionensuppressionen zu minimieren.

Es zeigte sich jedoch sehr rasch, dass mit den oben genannten Extraktionsmittel eine deutliche Verbesserung der bereits in der Literatur beschriebenen Bestimmungsgrenzen nicht erreicht werden kann.

2.3.2. Festphasenextraktion

In der Literatur gibt es einige Hinweise auf eine erfolgreiche Aufarbeitung von Plasmaproben mittels Festphasenextraktion. So konnte mit diversen C18 Materialien und Aminophasen eine Wiederfindung von bis zu 97% erzielt werden [19,25,27,74].

Versuche die Analyten aus Urin mittels Ionentauschern zu extrahieren waren ebenso erfolgreich [78].

Insgesamt musste jedoch zunächst mit Schwierigkeiten bei der Probenaufarbeitung mittels Festphasenextraktion gerechnet werden, weil Niacin und seine Metaboliten sehr polar sind und bei verschiedenen pH Werten unterschiedliche Ladungen besitzen.

Aus diesem Grund wurden auch schon Methoden beschrieben, die mehrere aufeinanderfolgende Festphasenschritte miteinander koppeln [74].

Ausprobiert wurden demnach folgende Sorbentien :

- Diverse C18
- C8
- C2
- Polymersubstanzen (hohe unspezifische Wechselwirkung)
- Ionentauscherphasen ($-\text{SO}_3\text{H}$)
- Mischphasen (Cx und Ionentauscher)

Die Ergebnisse dieser Versuche bestätigten, dass es sehr schwierig sein würde alle drei Analyten in einem Simultanschritt zu extrahieren.

Die meisten Phasen waren nur selektiv genug auf einen oder zwei der drei Analyten. In der Regel konnten nur die beiden sauren Verbindungen Nikotinsäure und Nikotinsäure nach der Waschprozedur simultan wieder von den Festphasensäulchen eluiert werden.

Ferner zeigten die erhaltenen Extrakte sehr unbefriedigende Empfindlichkeiten bei der Analyse im LC-MS System.

2.3.3. Proteinfällung

Zahlreiche in der Literatur beschriebene Methoden zur Bestimmung von Niacin beruhen auf einer Proteinfällung [18,20,21,22,23,24,26].

Dies stellt die einfachste Möglichkeit dar, die Proben aufzureinigen ohne die hydrophilen Analyten je von der wässrigen Matrix abtrennen zu müssen.

Allerdings wurde beobachtet, dass wässrige Proben, die auf diese Weise gewonnen wurden für quantitative Bestimmungen oft nicht den erforderlichen Reinheitsgrad aufweisen [20].

Dieser Befund hat sich dann auch bei folgenden Versuchen zur Proteinfällung bestätigt:

- mit Methanol
- mit Acetonitril
- mit Aceton und anschliessendem Waschen mit Chloroform
- mit Aceton und anschliessendem Waschen mit Chloroform, Hexan, Ether

Die erhaltenen Proben, die nach Abzentrifugieren des Niederschlags erhalten wurden, zeigten bei den Messungen sehr schlechte Empfindlichkeiten aber auch unbefriedigende Peakauflösungen.

Ferner verschmutzte die Ionenquelle zumeist schon nach wenigen Proben, so dass sehr rasch erkannt wurde, dass diese Methode in der Routineanalytik nicht anwendbar ist.

2.3.4. Säulenschaltung

Außerdem wurde versucht, die Proben mittels einer Anreicherungssäule (Waters Oasis) und einem Waschschrift unter hohem Fluss der wässrigen Phase (1 mL/min) aufzureinigen und anschliessend direkt oder über die analytische Säule ins MS System zu injizieren.

Diese Methode führte allerdings zu keinem befriedigenden Resultat, da hierbei offenbar die hohe Wasserlöslichkeit der Analyten über die zahlreichen unspezifischen Wechselwirkungen der Anreicherungssäule dominierte und deshalb die Analyten auf dieser keine Retention erfahren haben.

2.3.5. kombinierte Methoden

Nachdem alle bislang erzielten Extraktionsversuche unbefriedigend waren was die Reinheit der Extrakte betraf, wurde versucht die Aufarbeitungsschritte zu kombinieren, um Störsubstanzen zu eliminieren.

- Flüssig-Flüssig Verteilungen gefolgt von Festphasen-Extraktion
- Proteinfällungen gefolgt von Festphasen-Extraktion

All diese Experimente waren jedoch ebenso zum Scheitern verurteilt, da die Chromatographie des verwendeten Systems keine ausreichende Selektivität und Spezifität lieferte, was sich im Verlauf der Experimente zeigte.

Wurden all diese Extraktionsversuche dagegen mit Proben durchgeführt, in denen Wasser anstatt Plasma als Matrix verwendet wurde, ergaben sich in dem einen oder anderen Fall durchaus akzeptable Resultate.

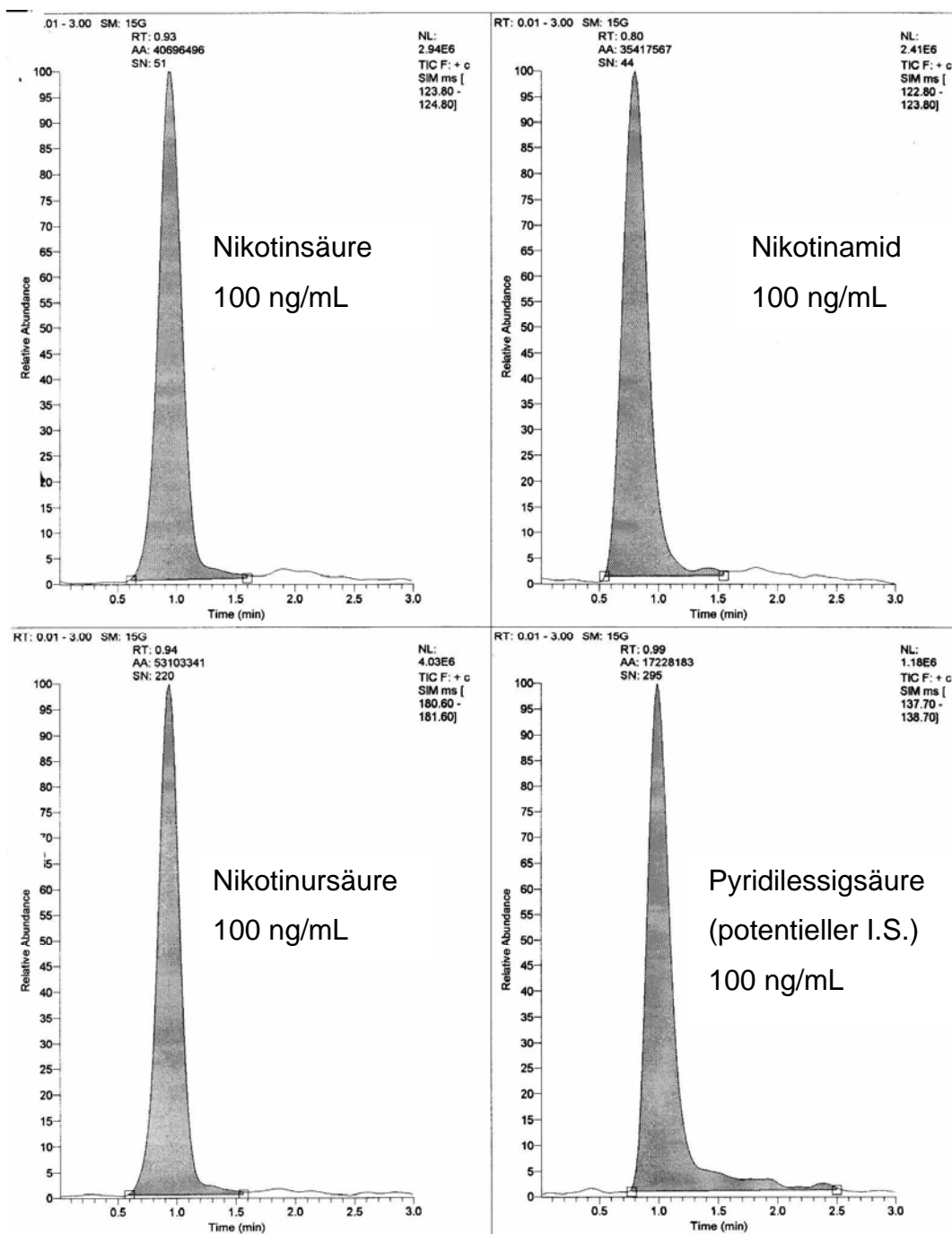
Sobald das Wasser jedoch durch Plasma ersetzt wurde, verschlechterten sich sowohl die Empfindlichkeit als auch die Reproduzierbarkeit. Daraus liess sich folgern, dass bei allen oben genannten Aufarbeitungsmethoden wohl immer Fremdsubstanzen ähnlichen chemischen Verhaltens wie Niacin mitextrahiert wurden.

Dies führte zu Ionensuppressionen, die jegliche Analytik unmöglich machten, wobei es, wie schon erwähnt, keine Rolle spielte, welche Art der Aufarbeitung angewandt wurde.

Wie sehr sowohl die Empfindlichkeit als auch die Auflösung der Signale durch Ionensuppression beeinträchtigt wurden, zeigt die folgende Abbildung. Sie stellt Chromatogramme von Niacin, Niacinamid und Nikotinursäure derselben Konzentration dar, aufgenommen in reiner Lösung und nach der Extraktion aus dem Plasma. Ebenso abgebildet ist ein potentieller interner Standard.

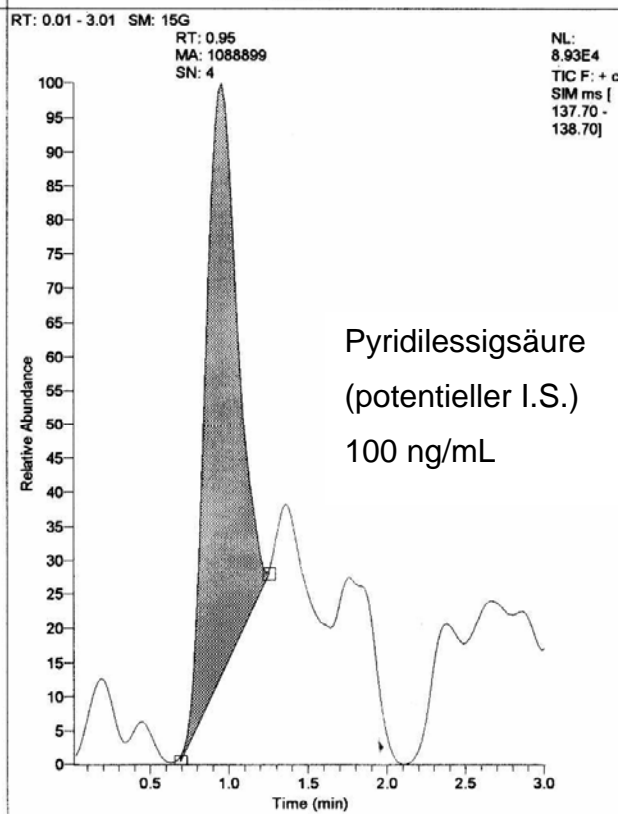
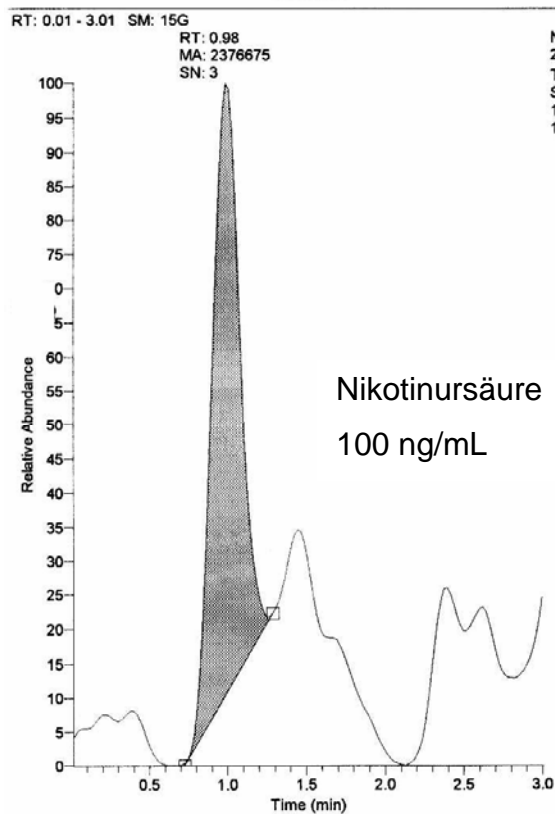
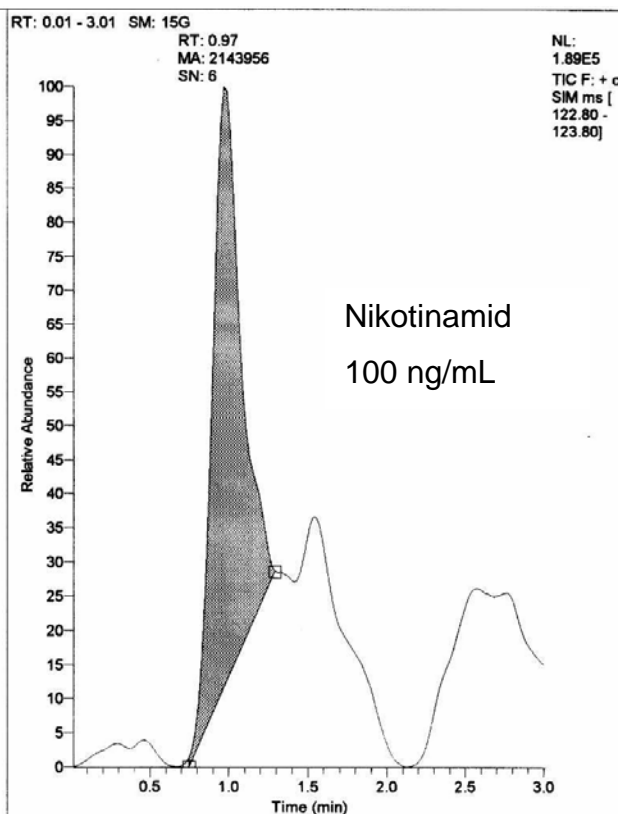
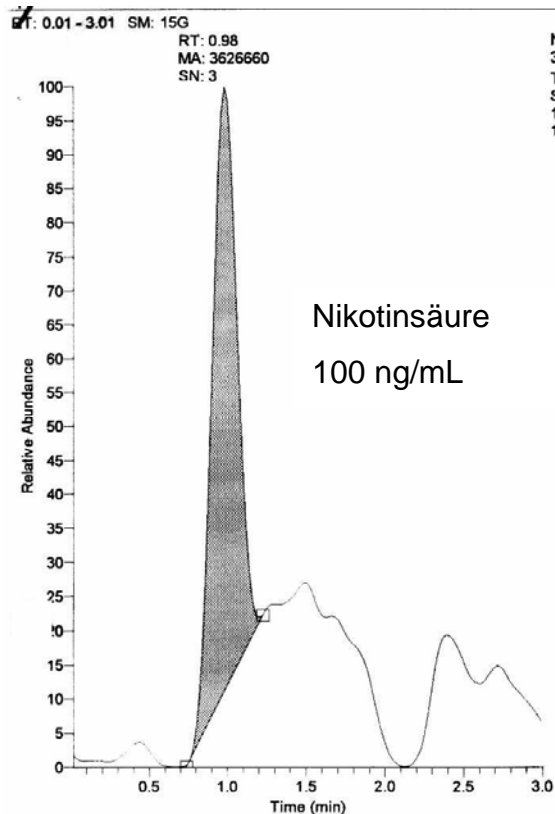
Abbildung 11 Chromatogramme der Analyten aus reiner Lösung und nach Extraktion aus Plasma

Reine Lösung :



Experimenteller Teil - Methodenentwicklung

Extrahierte Probe :

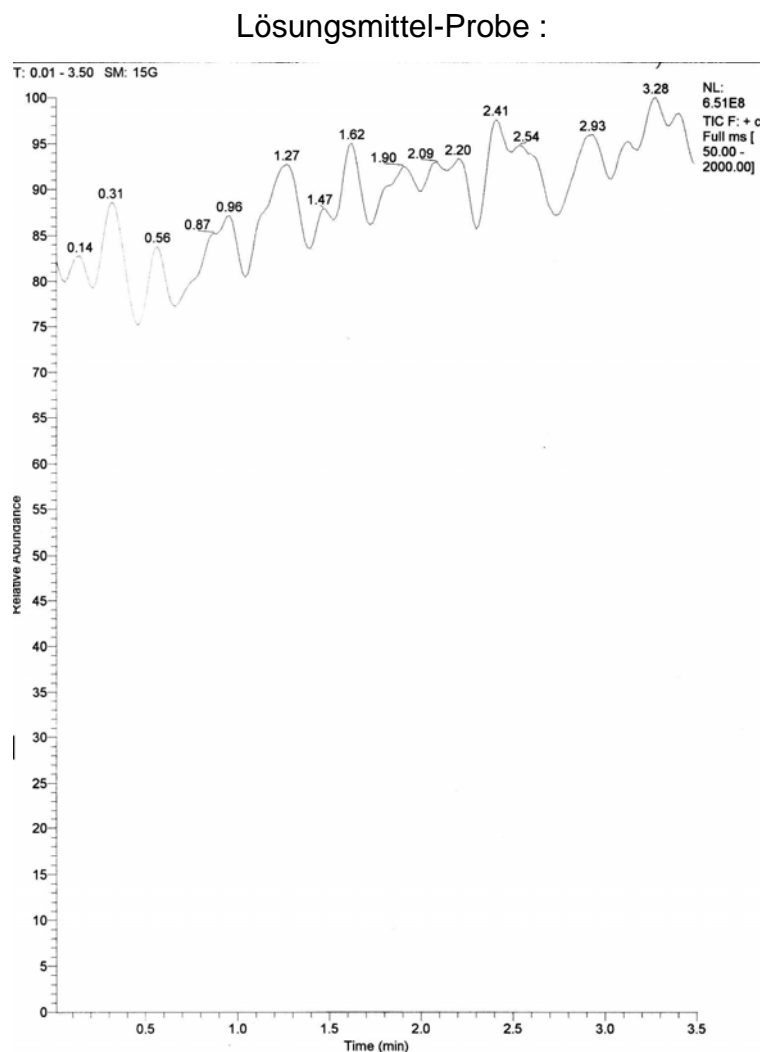


Sehr deutlich zu erkennen ist der Empfindlichkeitsverlust um den Faktor 10 und die schlechte Peakauflösung der Analyten nach der Extraktion aus dem Plasma im Vergleich zu den Chromatogrammen aus reinem Lösungsmittel.

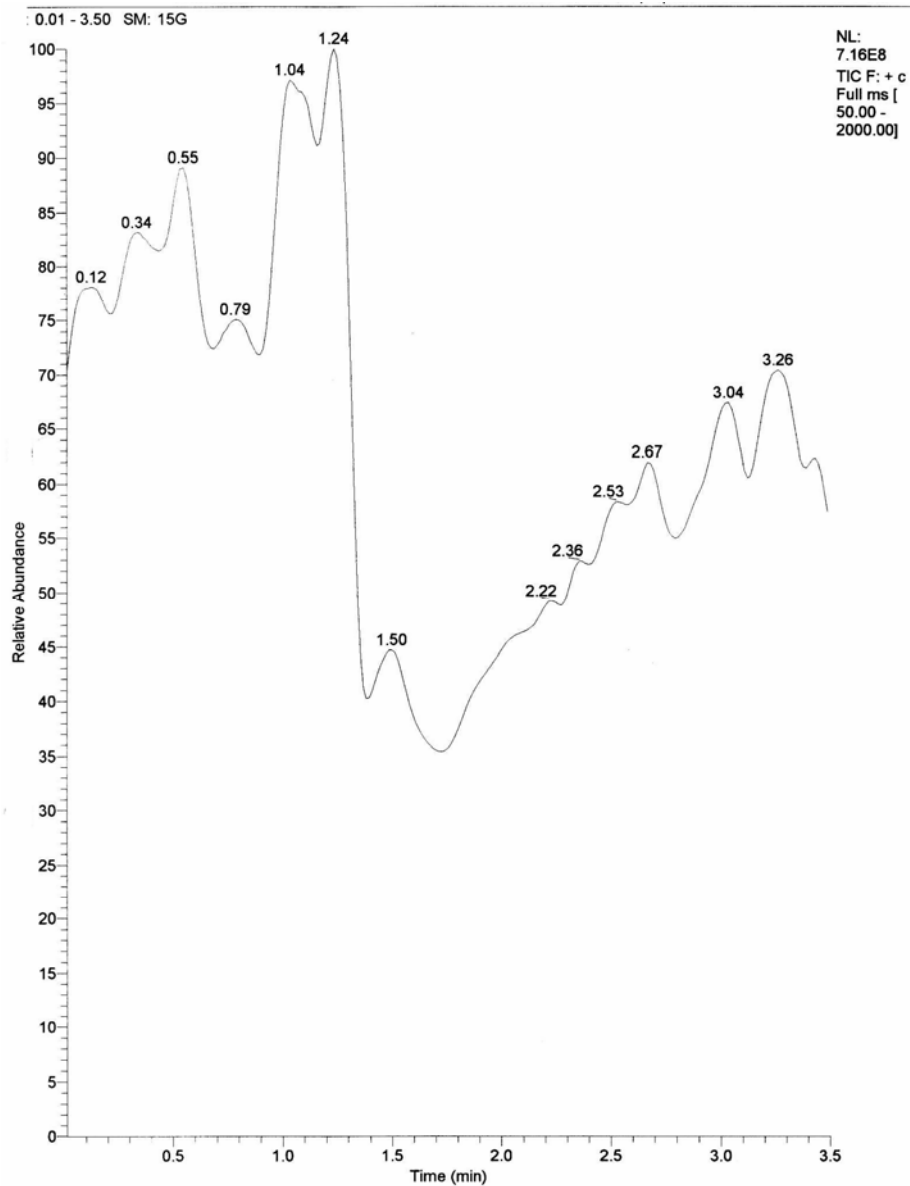
Daraufhin wurde ein Experiment durchgeführt, welches häufig angewandt wird; um die Gegenwart von Ionensuppression zu belegen.

Es wurden Lösungsmittel-Proben, um das Basisrauschen darzustellen und anschliessend Blank-Proben (d.h. ohne Zugabe von Analyten extrahierte Plasma-Proben) injiziert und die Basislinien der erhaltenen Chromatogramme miteinander verglichen.

Abbildung 12 Vergleich Lösungsmittel- und Blank-Probe



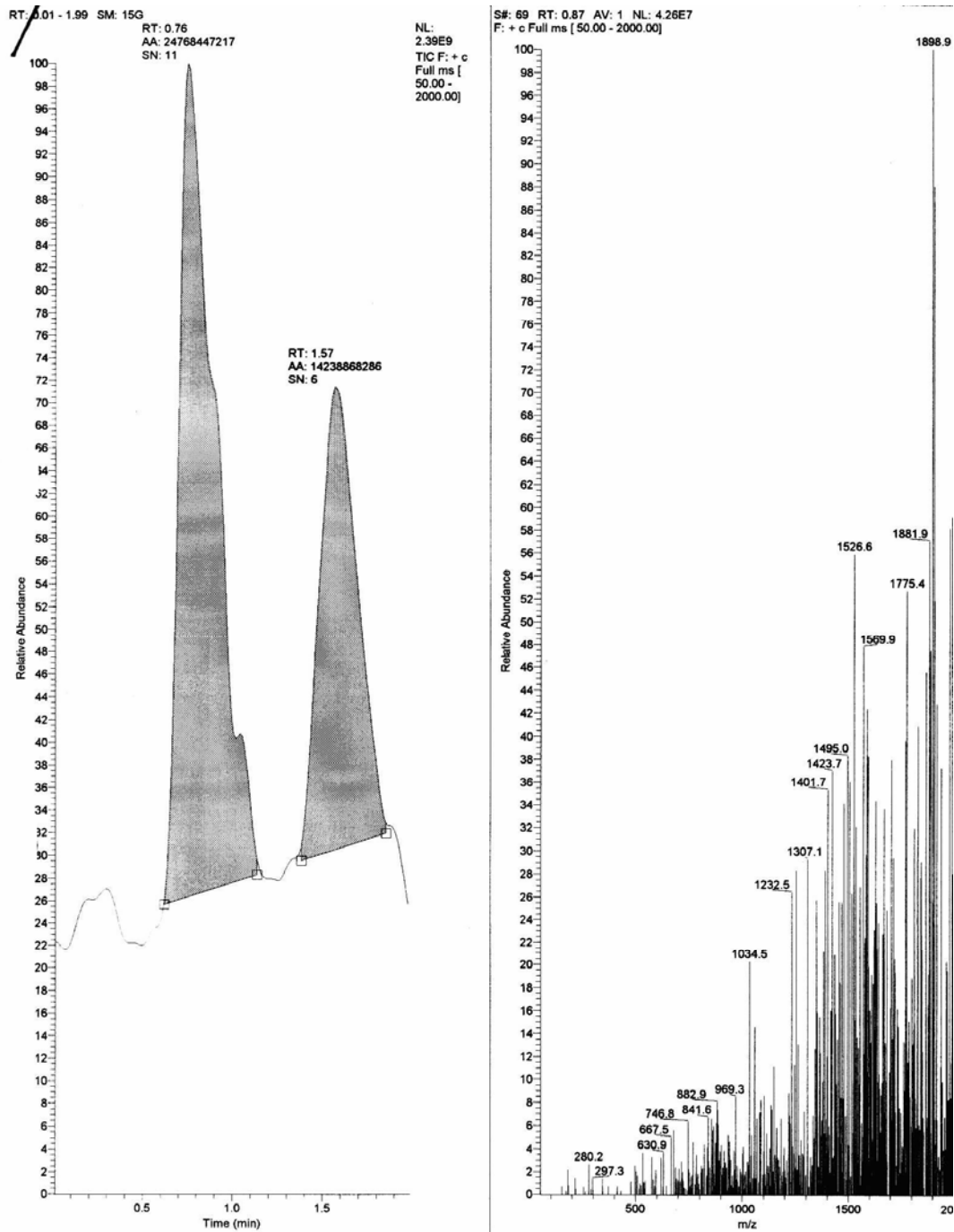
Blank -Probe:



Man erkennt mehr als deutlich den Einbruch der Basislinie genau an der Stelle, wo normalerweise die drei Analyten eluieren.

Auch das Fullscan Chromatogramm weist eine Vielzahl an Störsubstanzen auf, die zeitgleich mit den Analyten eluieren und bestätigt ebenfalls die Vermutung einer vorhandenen Ionensuppression.

Abbildung 13 Full Scan Chromatogramm einer Blank-Probe



Auch durch moderate Veränderungen der chromatographischen Bedingungen (Fluß oder Fließmittelzusammensetzung) liess sich dieser Sachverhalt nicht beseitigen. Vor diesem Hintergrund musste eine andere stationäre Phase gefunden werden, welche die unbekannten Störsubstanzen wirkungsvoll abtrennt.

2.4. Optimierung der Chromatographiebedingungen mit anderer stationärer Phase (CPS)

Gemäß dem Prinzip, dass polare Substanzen auch polar getrennt werden sollten wurde nun eine andere stationäre Phase gesucht, die noch polarere Eigenschaften besitzt als die bislang verwendete.

Die besten Resultate wurden mit der folgenden Säule erzielt

Hypersil CPS 250 x 2 mm, 5 µm Korngrösse ; Hersteller Fa. Grom Analytik,
D-72108 Rottenburg-Hailfingen

Die stationäre Phase besteht aus Kieselgel, das mit einer Cyanopropylgruppe modifiziert wurde und demnach große polare Wechselwirkungen mit den Analyten eingehen kann.

Bereits die ersten Versuche mit reinen Lösungen ergaben Retentionszeiten und k' - Werte, die weit über den bislang erreichten lagen.

Da aber die Selektivität eines chromatographischen Systems nicht allein von der stationären Phase abhängt, sondern auch von der mobilen Phase, wurde anschliessend versucht, die mobile Phase in zahlreichen Versuchen zu optimieren. Somit ergaben sich folgende chromatographische Bedingungen:

HPLC Säule : Hypersil CPS 250 x 2 mm, 5 µm Korngrösse ; Hersteller Fa. Grom
Analytik, D-72108 Rottenburg-Hailfingen

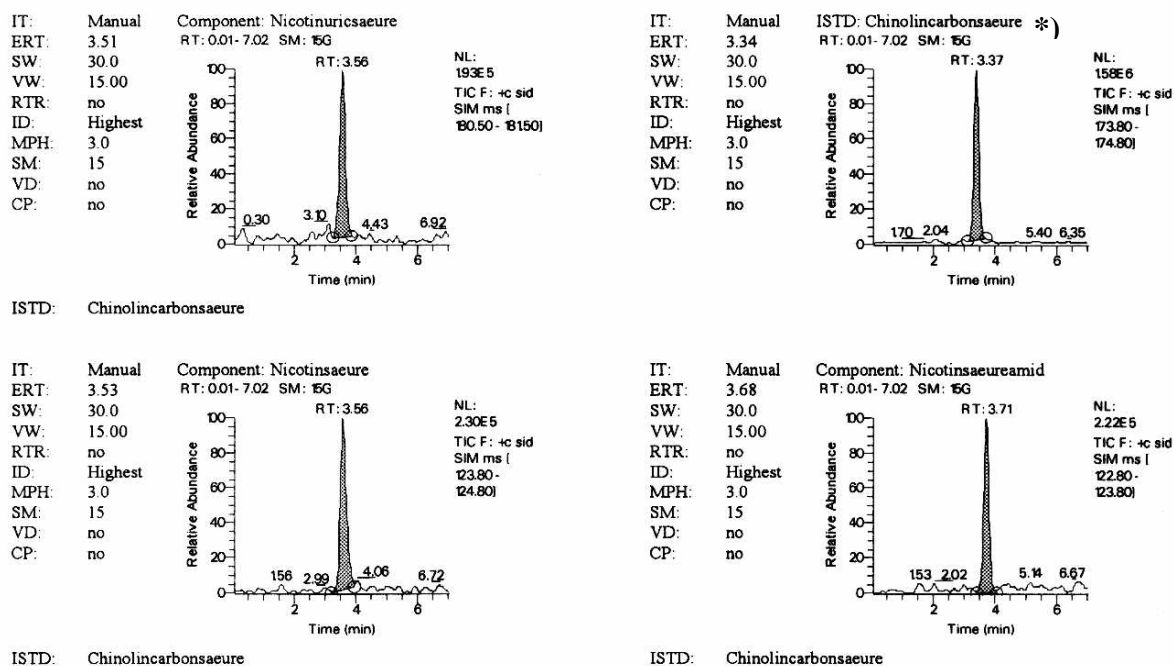
Mobile Phase: Acetonitril:Methanol:H₂O:Ameisensäure (v:v:v:v) (700:190:110:1)

Flussgeschwindigkeit : 0.2 mL / min

Diese Modifikationen in der stationären und mobilen Phase führte schließlich zu akzeptabler Retention und Auflösung wie folgende Abbildung belegt:

Experimenteller Teil - Methodenentwicklung

Abbildung 14 Chromatogramm einer mit 100 ng/mL dotierten Probe auf Cyanopropyl-Säule aus Wasser



Component Results								
Name	Area	Area Ratio	Area ISTD	Specified Amount	Calculated Amount	%Diff	S/N	BL
Nicotinuricsaeure	2396242	0.138	17350427	100.000 ng/ml	109.091 ng/ml	9.09	15	MM
Chinolincarbonsaeure	17350427	N/A	N/A	250.000 ng/ml	N/A	N/A	76	MM
Nicotinsaeure	3223877	0.186	17350427	100.000 ng/ml	91.458 ng/ml	-8.54	29	MM
Nicotinsaeureamid	2674558	0.154	17350427	100.000 ng/ml	97.654 ng/ml	-2.35	28	MM

*) Chinolincarbonsäure wurde als potentieller interner Standard getestet

2.5. Wiederholung der Extraktionsversuche mit ausreichend selektiver Chromatographie

Nachdem die Ergebnisse der bereits aufgeführten Extraktionen unter den zuvor angewandten chromatographischen Bedingungen infolge der nicht ausreichenden Selektivität nicht aussagekräftig waren, wurden sämtliche Extraktions-Experimente mit dem neuen LC System wiederholt.

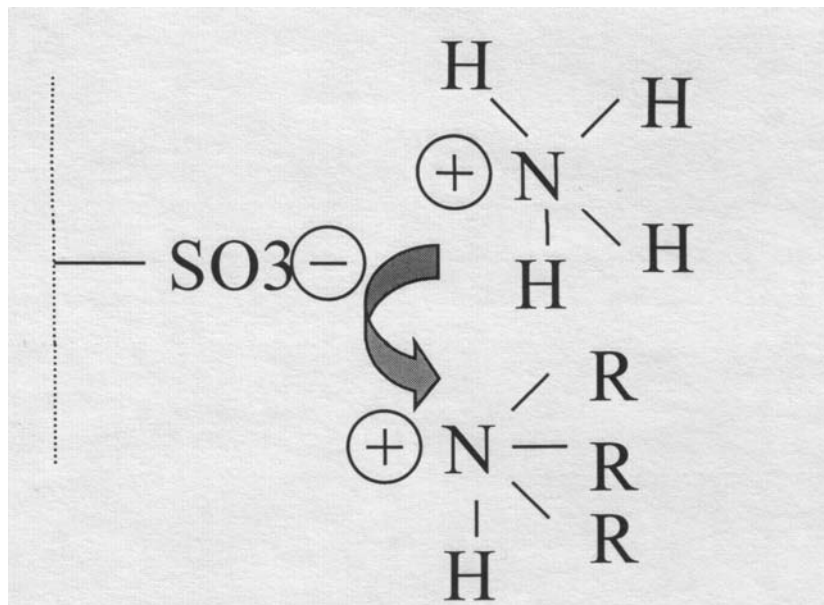
Experimenteller Teil - Methodenentwicklung

In den vorangegangenen Versuchen wurde bereits erkannt, dass die Extraktion einer derart hydrophilen Verbindungsklasse aus einer wässrigen Matrix am effektivsten über Festphasenextraktion durchzuführen ist.

Die besten Resultate wurden dabei mit Hilfe eines starken Ionentauschers erzielt.

Diese Ionentauscher nutzen die basische Funktion des Pyridinrings von Niacin und dessen Metaboliten aus.

Abbildung 15 Funktionsweise des SPE Ionentauschers



Vor Aufgabe auf den Ionentauscher muss die Probe angesäuert werden, um die entsprechenden Kationen zu erhalten.

Danach kann die SPE Säule ausgiebig gewaschen werden, auch mit Methanol und Acetonitril, denn die Elution erfolgt erst nach Zugabe einer stärkeren Base, die den Analyten wieder verdrängen kann.

Somit konnten ausreichend aufgereinigte Extrakte über die folgenden Aufarbeitungsschritte gewonnen werden (eine detaillierte Beschreibung findet sich im Validierungsteil in Kapitel 3.2.1):

- verwendeter Ionentauscher: Separtis Isolute SCX SPE-columns, 500 mg , 3 mL
- angesäuerte Probe aufgeben
- Waschvorgänge mit 0.1% Ameisensäure, Acetonitril, Methanol, Hexan
- Elution mit Methanol (2% Ammoniak)

2.6. Auswahl eines Internen Standards

Da für bioanalytische Methoden die Interne-Standard Methode zu empfehlen ist, weil sie unter anderem mögliche Verluste bei der Extraktion oder Matrixeffekte bei der Messung ausgleichen kann, galt es nunmehr einen geeigneten Internen Standard für die quantitative Bestimmung von Niacin und dessen Metaboliten in Plasma zu finden.

Versuche mit einer Vielzahl chemisch ähnlicher Verbindungen, wie z.B. diverse Nikotinsäureester oder Pyridilelessigsäure blieben erfolglos, teils aufgrund schlechter Reproduzierbarkeit oder chromatographischer Probleme.

Erste Versuche mit Iso-Nikotinsäure waren sehr vielversprechend was sowohl Linearität als auch Reproduzierbarkeit betraf.

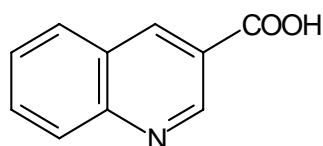
Obwohl Iso-Nikotinsäure die selbe Molekülmasse aufweist wie Nikotinsäure, war die chromatographische Trennung der beiden Verbindungen vor dem Hintergrund ihrer Basislinien-Trennung ausreichend. Später offenbarte sich jedoch ein Umstand, der in vielen Methoden und Publikationen unterschätzt wird, nämlich die Robustheit einer Methode.

HPLC Säulen, die bioanalytischen Methoden unterworfen werden, verändern infolge des Auftrags zahlreicher Matrixkomponenten ihre Eigenschaften. Das hatte zur Folge, dass nach einer Vielzahl von extrahierten Proben, die Selektivität der HPLC Säule in der Art nachliess, dass die Peaks von Nikotinsäure und Iso-Nikotinsäure nicht mehr getrennt werden konnten. Und da die Molekülmassen identisch sind, war auch keine quantitative Bestimmung mehr möglich.

Experimenteller Teil - Methodenentwicklung

Dies gab Anlass dazu, eine Verbindung als internen Standard zu wählen, die eine von den Analyten verschiedene Molekülmasse besitzt.

Mit dem Chinolin analogen Molekül der Nikotinsäure, der Chinolin-3-Carbonsäure, als internen Standard verliefen die Vorversuche vielversprechend und letztlich konnte die im folgenden Kapitel beschriebene Methoden-Validierung damit erfolgreich durchgeführt werden.



Summenformel: $C_{10}H_7NO_2$
Molekulargewicht: 173.2 g/mol

Der Kalibrierbereich wurde in diesen Vorversuchen auf 50.0 – 750 ng/mL Plasma festgesetzt. Unterhalb 50.0 ng/mL war keine ausreichende Reproduzierbarkeit mehr gegeben, oberhalb 750 ng/mL keine ausreichende Linearität.

Folgende Abbildungen zeigen die Kalibrierkurven für die jeweiligen Analyten, die mit folgenden analytischen Bedingungen (detaillierte Beschreibung in Kapitel 3), die sich schließlich als die besten erwiesen, erhalten wurden.

Detektor :	Finnigan LCQ Ion Trap LC-MS im SIM Modus; positive Ionen mittels ESI
Probenaufarbeitung :	Festphasenextraktion mittels Kationenaustauscher Isolute SCX SPE-columns; Hersteller Separtis
HPLC Säule :	Hypersil CPS 250 x 2 mm, 5 μ m Korngrösse ; Hersteller Fa. Grom Analytik, D-72108 Rottenburg-Hailfingen
Mobile Phase :	Acetonitril:Methanol:H ₂ O:Ameisensäure (700:190:110:1); (v:v:v:v)
Fluss :	isokratisch 0.2 mL / min
Kalibrierter Bereich :	50.0 – 750 ng/mL Plasma (für alle Analyten)
Interner Standard :	Chinolin-3-Carbonsäure

Abbildung 16 Kalibrierkurve Nikotinsäure

Kalibrierungskurve Nikotinsäure in Plasma

ng/mL	p.a.r.	ng/mL(calc)	dev [%]
50.0	0.0954	45.7	-8.6
75.0	0.1598	82.7	10.3
125	0.2204	118	-6.0
150	0.3119	170	13.4
250	0.4683	260	4.0
500	0.8024	452	-9.6
750	1.2736	723	-3.6

p.a.r. = peak area ratio

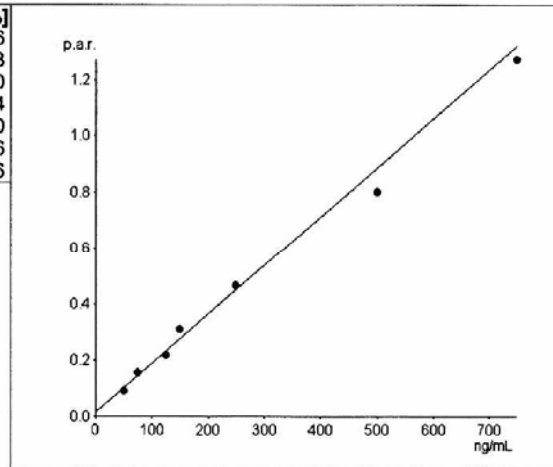


Abbildung 17 Kalibrierkurve Nikotinamid

Kalibrierungskurve Nicotinsäureamid in Plasma

ng/mL	p.a.r.	ng/mL(calc)	dev [%]
50.0	0.0880	51.3	2.6
75.0	0.1197	72.9	-2.8
125	0.1903	121	-3.2
150	0.2330	150	0.0
250	0.3922	258	3.4
500	0.7271	486	-2.7
750	1.1452	771	2.8

p.a.r. = peak area ratio

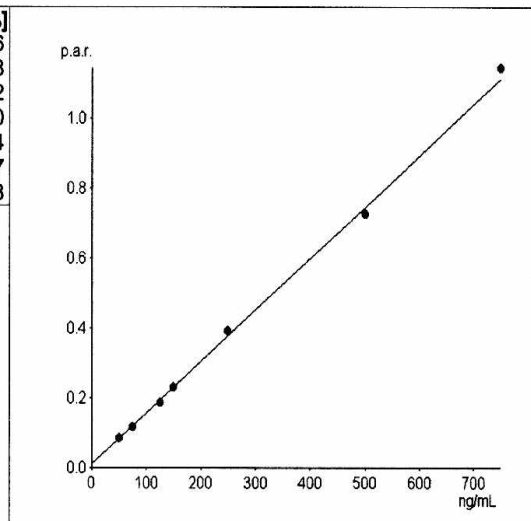
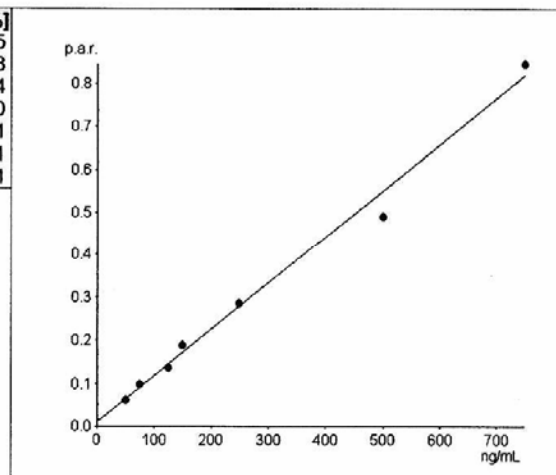


Abbildung 18 Kalibrierkurve Nikotinursäure

Kalibrierungskurve Nikotinursäure in Plasma

ng/mL	p.a.r.	ng/mL(calc)	dev [%]
50.0	0.0626	47.3	-5.5
75.0	0.0989	80.8	7.8
125	0.1380	117	-6.4
150	0.1899	165	10.0
250	0.2875	255	2.1
500	0.4917	444	-11.1
750	0.8474	773	3.1

p.a.r. = peak area ratio



3. Validierung der bioanalytischen Methode

An dieser Stelle erfolgt nun eine detaillierte Beschreibung der entwickelten analytischen Methode zur quantitativen Bestimmung von Niacin und dessen Metaboliten Niacinamid sowie Nikotinursäure in Humanplasma und deren Validierung.

3.1. Überblick über die verwendeten Chemikalien und Geräte

3.1.1. Lösemittel, Reagenzien und Festphasensäulen

Tabelle 2 Lösemittel, Reagenzien und Festphasen(SPE)-Säulen

Verwendete Chemikalien, bzw. SPE-Säule	Hersteller	Produkt Nr.
Isolute SCX SPE-columns, 500 mg , 3 mL	Separtis	530-0050-B
H ₂ O	Merck	1.15333
Methanol	Merck	106007
Acetonitril	Merck	30.2500
n-Hexan	Merck	1.04374
Ammoniaklösung	Baker	6051
Ameisensäure	Fluka	06400

Alle Chemikalien waren von p.a. Qualität.

3.1.2. Laborgeräte und LC-Geräte

Tabelle 3 Laborgeräte und LC-Geräte

Gerät	Hersteller	Typ
HPLC Säule	Grom	Hypersil CPS 250 x 2 mm,5 µm
HPLC Pumpe	Agilent	1100
HPLC Autosampler	Agilent	1100
Zentrifuge	Heraeus	Varifuge RF
Überkopfschüttler	Heidolph	Reax
Vortex Schüttler	IKA	Vibrofix
Abdampfblock	Liebisch	-
Analytische Waage	Sartorius	R160 P-D1

3.1.3. Referenzsubstanzen

Tabelle 4 Referenzsubstanzen

Substanz	Lieferant	Batch/Lot
Nikotinsäure	Sigma	069H0741
Nikotinamid	Sigma	128H1168
Nikotinursäure	Sigma	068F0329
Chinolin-3-Carbonsäure	Fluka	2293373

Die Referenzsubstanzen wurden in der Form verwendet, wie sie geliefert wurden, d.h. ohne jegliche Vorbehandlung.

3.1.4. Herstellung der Stammlösungen

3.1.4.1. Stammlösungen Nikotinsäure

Eine konzentrierte Stammlösung 1 (SS1) von 100 ng/μL wurde hergestellt, indem 10.0 mg Nikotinsäure in einen 100 mL Rundkolben eingewogen und in Methanol gelöst wurden.

Diese Prozedur wurde ein zweites Mal wiederholt um eine Stammlösung 2 (SS2) zu erhalten.

Die Lösungen wurden im Kühlschrank aufbewahrt.

3.1.4.2. Stammlösungen Nikotinsäureamid und Nikotinursäure

Hier wurde analog zur Nikotinsäure vorgegangen, indem jeweils 10.0 mg Nikotinsäureamid bzw. Nikotinursäure in doppelter Ausführung in je 100 mL Methanol gelöst wurden, um jeweils eine Stammlösung 1 (SS1) und Stammlösung 2 (SS2) der beiden Substanzen mit Konzentrationen von je 100 ng/μL zu erhalten. Die Aufbewahrung erfolgte im Kühlschrank.

3.1.4.3. Stammlösung des Internen Standards 3-Chinolin-Carbonsäure

Zur Herstellung der Stammlösung des Internen Standards (SS I.S.) wurden 10.0 mg 3-Chinolin-Carbonsäure in 100 mL Methanol gelöst, was eine Konzentration von 100 ng/ μ L ergab.

Auch diese Lösung wurde bis zur jeweiligen Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

3.1.5. Herstellung der Kalibrierstandards und Qualitäts (QC-) Kontrollproben

Die Kalibrierstandards wurden im Bereich von 50.0 – 750 ng/mL täglich frisch hergestellt, indem 1 mL Blank Plasma mit 25 μ L geeigneter Arbeitslösungen der drei Analyten versetzt wurde, welche aus den entsprechenden Stammlösungen 1 hergestellt wurden.

Die zur Validierung verwendeten Qualitäts-Kontrollproben wurden analog zu den Kalibrierstandards hergestellt, indem 1 mL Blank Plasma mit 25 μ L der entsprechenden Arbeitslösungen versetzt wurden, die allerdings aus den entsprechenden Stammlösungen 2 verdünnt wurden.

Ferner wurden die Qualitäts-Kontrollproben in 3 verschiedenen Konzentrationen zu den Kalibrierstandards hergestellt, nämlich im unteren, im mittleren und im hohen Bereich der Kalibrierung.

3.1.5.1. Herstellung der Kalibrierstandards

Zu Beginn der Validierung wurde zur Herstellung der Kalibrierstandards für den täglichen Bedarf eine ausreichende Menge an Arbeitslösungen durch geeignete Verdünnung der Stammlösungen 1 hergestellt.

Die Konzentrationen der Kalibrierstandards betrugen jeweils 50.0, 75.0, 125, 150, 250, 500 und 750 ng Nikotinsäure, Nikotinamid bzw. Nikotinursäure pro mL Plasma.

Validierung der bioanalytischen Methode

Tabelle 5 Herstellungsschema der Arbeitslösungen zur Herstellung der Kalibrierstandards

Ausgangslösung	Verdünt auf [mL] (mit Methanol)	erhaltene Konz. Niacin, Nikotinursäure und Nikotinamid [ng/μL]	Bezeichnung der Lösung	Erhaltene Standard-Konz. an Niacin, Nikotinursäure und Nikotinamid *[ng/mL]
3.00 mL SS1 von jeder Referenzsubstanz	10.0	30.0	AK-1	750
2.00 mL SS1 von jeder Referenzsubstanz	10.0	20.0	AK-2	500
1.00 mL SS1 von jeder Referenzsubstanz	10.0	10.0	AK-3	250
0.60 mL SS1 von jeder Referenzsubstanz	10.0	6.00	AK-4	150
0.50 mL SS1 von jeder Referenzsubstanz	10.0	5.00	AK-5	125
0.30 mL SS1 von jeder Referenzsubstanz	10.0	3.00	AK-6	75.0
0.20 mL SS1 von jeder Referenzsubstanz	10.0	2.00	AK-7	50.0

*) 1 mL Plasma versetzt mit 25.0 μL der betreffenden Arbeitslösung.

3.1.5.2. Herstellung der Qualitäts-Kontrollproben

Drei unterschiedliche Konzentrationen an Qualitäts-Kontrollproben (100, 300 und 600 ng/mL eines jeden Analyten) wurden zu Beginn der Validierung hergestellt, indem 1 mL Blank Plasma mit 25 μL der entsprechenden Arbeitslösung aus Stammlösung 2 versetzt wurden.

Validierung der bioanalytischen Methode

Tabelle 6 Herstellungsschema der Arbeitslösungen der Qualitäts-Kontrollproben

Ausgangslösung	Verdünt auf [mL] (mit Methanol)	erhaltene Konz. Niacin, Nikotinursäure und Nikotinamid [ng/μL]	Bezeichnung der Lösung	Erhaltene QC Konz. an Niacin, Nikotinursäure und Nikotinamid *[ng/mL]
2.40 mL SS2 von jeder Referenzsubstanz	10.0	24.0	AQ-1	600
1.20 mL SS2 von jeder Referenzsubstanz	10.0	12.0	AQ-2	300
0.40 mL SS2 von jeder Referenzsubstanz	10.0	4.00	AQ-3	100

*) 1 mL Plasma versetzt mit 25.0 μL der betreffenden Arbeitslösung.

3.1.5.3. Arbeitslösung des Internen Standards

Die Arbeitslösung des Internen Standards wurde durch Verdünnung in entsprechenden Meßkolben nach folgender Vorschrift hergestellt:

Tabelle 7 Arbeitslösung Interner Standard Chinolin-3-carbonsäure

Volumen [mL]	von Lösung	verdünnt auf [mL]	mit	resultierende Verdünnung
1	SS I.S.	10	Methanol	10 ng/μL

3.1.6. Verarbeitung der elektronischen Daten

Rohdaten wurden von dem elektronischen System des LC-MS Detektors aufgezeichnet. Die weiteren Berechnungen wurden mittels einem IBM-PC kompatiblen Systems, DB-LabCal, welches bei AAI Deutschland GmbH entwickelt und validiert wurde, vorgenommen.

3.2. Arbeitsanweisungen

3.2.1. Extraktionsvorschrift

- a) Für jeden Eichkurvenpunkt wird 1 mL Nullplasma abpipettiert und dann 25 µL der entsprechenden Arbeitslösung zugegeben.
- b) Zu jeder Probe (Eichkurve, QC, Proband) werden 25 µL Interner Standard (Chinolinsäure 10ng/µL) zugegeben.
- c) Die Proben werden mit dem Whirlimixer kurz aufgeschüttelt.
- d) 1 mL 1% Ameisensäure wird hinzugefügt und aufgeschüttelt.
- e) Die Festphasensäulchen Isolute SCX (500 mg, 3 mL) werden mit 2 mL Methanol vorkonditioniert.
- f) Die Festphasensäulen werden mit 2 mL 1% Ameisensäure gewaschen.
- g) Die jeweilige Probe wird **sehr langsam** (ca. 2 min) einsickern gelassen.
- h) Die Festphasensäulchen werden danach trocken gesaugt.
- i) Die Festphasensäulchen werden dann mit 2 mL Acetonitril und 2 mL Methanol gewaschen und erneut trocken gesaugt.
- j) Die Festphasensäulchen werden daraufhin mit 2 mL Hexan gewaschen und wiederum trocken gesaugt.
- k) Dann werden die Analyten mit 2 x 2 mL Methanol (2% Ammoniak) (alle 2Tage frisch herstellen) in ein sauberes Spitzglas eluiert.
- l) Das Lösungsmittel wird dann im Stickstoffstrom bei 45°C abgedampft.
- m) Der eingedampfte Rückstand wird in 30 µL H₂O aufgenommen, kurz aufgeschüttelt und 5 min zentrifugiert.
- n) Der Extrakt wird in ein zur Injektion geeignetes Probengefäß abgefüllt.

3.2.2. LC-Bedingungen

Tabelle 8 LC Bedingungen

HPLC Säule	Grom, Hypersil CPS 250 x 2 mm, 5 µm ; (Part-No.: HSCN 10512S2502)
Fließmittel	Acetonitril:Methanol:H ₂ O:Ameisensäure (V:V:V:V 700:190:110:1)
Fluss - Dauer	0.2 mL/min - Laufzeit 8 min.
Injektionsmenge	ca. 3 µL – je nach benötigter Empfindlichkeit

Validierung der bioanalytischen Methode

3.2.3. MS-Bedingungen

3.2.3.1. Allgemeine Geräteparameter

Tabelle 9 MS Bedingungen – allgemeine Parameter

Bestandteil / Bedingung	Art / Beschreibung	Einstellung
MS-Detektor	Finnigan MAT LCQ	
Ionenquelle	ESI	Positive Ionen
Ionisierung	Elektrospray Ionisierung	
Scan-Modus	Centroid	
Software	Finnigan MAT LCQ-Software "Navigator" Version 1.2	
Instrument Einstellungen *)		
	sheath gas flow	85 arb. Units
	auxiliary gas flow	25 arb. Units
	spray voltage	7kV
	capillary temperature	150 °C
	capillary voltage	10 V
	tube lens offset	-16 V
	octapole 1 offset	-2.00 V
	octapole 2 offset	-5.20 V
	interoctapole lens voltage	-16.7 V
	octapole RF amplitude	400 Vp-p
	maximum injection time	100 ms
	Source CID	On (5%)
	MS AGC target	On
	MS micro scans	1
	scan time	8.00 min

*) je nach Gerätetyp können zur erforderlichen Empfindlichkeit und Selektivität auch andere Einstellungen gewählt werden

3.2.3.2. Scan Modus Einstellungen

Tabelle 10 Scan- Parameter

Segment 1 - 1 Scan Event	
Detektion von Niacin	
Scan Event 1	Niacin
Scan time	0 – 8.0 min
Polarität	positiv
SIM Mass Ranges	m/z = 123.8 – 124.8
Segment 1 – 2 Scan Event	
Detektion von Nikotinursäure	
Scan Event 2	Nikotinursäure
Scan time	0 – 8.0 min
Polarität	positiv
SIM Mass Ranges	m/z = 180.5 – 181.5
Segment 1 - 3 Scan Event	
Detektion von Nikotinamid	
Scan Event 3	Nikotinamid
Scan time	0 – 8.0 min
Polarität	positiv
SIM Mass Ranges	m/z = 122.8 – 123.8
Segment 1 – 4 Scan Event	
Detektion of Chinolin-3-Carbonsäure	
Scan Event 4	Chinolin-3-Carbonsäure
Scan time	0 – 8.0 min
Polarität	positiv
SIM Mass Ranges	m/z = 173.8 – 174.8

3.2.4. Auswertung

Die Peakflächen wurden automatisch mittels der im Finnigan LCQ integrierten Software Navigator 1.2 berechnet. Die chromatographischen Daten wurden anschließend in die analytische Datenbank Software DB-LabCal (programmiert und validiert bei AAI Deutschland GmbH) transferiert und dort weiter ausgewertet.

3.2.4.1. Berechnung der Konzentrationen der Analyten

Die Konzentrationen der Analyten wurden mittels der Internen-Standard Methode berechnet. Die Eichgeraden wurden über das Peakflächen-Verhältnis (p.a.r.) von Analyten / Internem Standard mittels linearer Regression mit $1/x^2$ Wichtung ermittelt. Die Konzentrationen der QC- und Validierungsproben wurden mittels Interpolation der zugehörigen Eichgeraden berechnet.

Gleichung 3 Berechnung der Konzentration der Analyten

Geradengleichung : **$y = a + bx$**

x = Konzentration des Analyten

y = p.a.r (Peakflächenverhältnis Analyt / Interner Standard)

b = Steigung der Geraden

a = intercept (y-Achsenabschnitt) der Geraden

Somit ergibt sich zur Berechnung der Konzentrationen der Analyten :

$$\text{Konzentration}(\text{Analyt}) = \frac{p.a.r.(\text{Analyt}) - a}{b}$$

Die Konzentrationen wurden in ng pro mL Plasma angegeben !

3.2.4.2. Richtigkeit und Genauigkeit der Messungen

Während mit der Richtigkeit der Messung gemeint ist, wie genau der wahre Wert im Vergleich zum Nominalwert gemessen wurde, versteht man unter der Genauigkeit die Streubreite, die man bei wiederholter Messung erhält.

Validierung der bioanalytischen Methode

Um die Richtigkeit (bias) und die Genauigkeit (cv) der Messungen zu bewerten, wurden folgende Gleichungen benützt:

Gleichung 4 Richtigkeit und Genauigkeit der Messungen

Richtigkeit:

$$bias [\%] = 100 \times \frac{\text{berechneteKonzentration} - \text{festgelegteKonzentration}}{\text{festgelegteKonzentration}}$$

Genauigkeit:

$$cv [\%] = 100 \times \frac{\text{Standard Abweichung}}{\text{Durchschnittswert}}$$

3.3. Ergebnisse der Validierung

3.3.1. Leistungsfähigkeit der Methode

3.3.1.1. Interday Richtigkeit und Genauigkeit

Um die Genauigkeit und Richtigkeit der Methode zwischen verschiedenen Messtagen (Interday) zu ermitteln, wurden 6 verschiedene Standard-Eichkurven an 3 verschiedenen Tagen zusammen mit je 2 Sätzen an QC-Proben gemessen.

Die Ergebnisse für die Richtigkeit (bias) und Genauigkeit (cv) sind in den folgenden Tabellen dargestellt:

Tabelle 11 Ergebnisse der Interday Richtigkeit und Präzision - Nikotinsäure

Nikotinsäure :	Nominal-Konzentrationen in [ng/mL]						
Analysen - Sequenz	50.0	75.0	125	150	250	500	750
	Berechnete Konzentrationen in [ng/mL]						
1	45.7	82.7	118	170	260	452	723
2	48.8	75.3	135	149	235	543	690
3	52.4	62.8	141	159	238	493	740
4	53.7	65.0	127	156	233	522	765
5	45.2	82.7	142	142	244	489	715
6	51.2	66.9	137	155	250	528	675
n	6	6	6	6	6	6	6
Mittelwert	49.5	72.6	133	155	243	505	718
Standardabw.	3.54	8.89	9.41	9.44	10.2	33.2	32.5
cv [%]	7.1	12.3	7.1	6.1	4.2	6.6	4.5
bias [%]	-1.0	-3.2	6.7	3.5	-2.6	0.9	-4.3

Validierung der bioanalytischen Methode

Tabelle 12 Ergebnisse der Interday Richtigkeit und Präzision - Nikotinamid

Nikotinamid :	Nominal-Konzentrationen in [ng/mL]						
Analysen - Sequenz	50.0	75.0	125	150	250	500	750
	Berechnete Konzentrationen in [ng/mL]						
1	51.3	72.9	121	150	258	486	771
2	51.6	72.1	112	158	272	538	672
3	53.3	66.9	125	157	228	522	775
4	48.5	(96.9) A	140	148	233	483	764
5	48.0	76.8	146	132	252	482	750
6	50.5	77.8	109	150	260	569	675
n	6	5	6	6	6	6	6
Mittelwert	50.5	73.3	126	149	251	513	734
Standardabw.	1.98	4.35	14.7	9.56	16.6	35.6	48.0
cv [%]	3.9	5.9	11.7	6.4	6.6	6.9	6.5
bias [%]	1.0	-2.3	0.5	-0.5	0.3	2.6	-2.1

A: Ausreisser (Abweichung > 30%)– wurde für statistische Auswertung nicht verwendet

Tabelle 13 Ergebnisse der Interday Richtigkeit und Präzision - Nikotinursäure

Nikotinursäure:	Nominal-Konzentrationen in [ng/mL]						
Analysen - Sequenz	50.0	75.0	125	150	250	500	750
	Berechnete Konzentrationen in [ng/mL]						
1	47.3	80.8	117	165	255	444	773
2	49.2	76.9	139	132	237	526	751
3	51.4	69.1	(162) A	163	244	507	728
4	44.8	85.3	134	145	252	488	710
5	54.9	68.5	113	138	275	502	796
6	49.0	79.6	131	128	250	558	703
n	6	6	5	6	6	6	6
Mittelwert	49.4	76.7	127	145	252	504	743
Standardabw.	3.47	6.68	11.1	15.7	12.9	38.1	36.7
cv [%]	7.0	8.7	8.7	10.8	5.1	7.6	4.9
bias [%]	-1.1	2.3	1.4	-3.2	0.9	0.8	-0.9

A: Ausreisser (Abweichung > 30%)– wurde für statistische Auswertung nicht verwendet

Validierung der bioanalytischen Methode

Tabelle 14 Ergebnisse der Interday Richtigkeit und Präzision - Qualitätskontrollproben Nikotinsäure

Nikotinsäure :	Nominal-Konzentrationen in [ng/mL]		
Analysen-Sequenz	100	300	600
	Berechnete Konzentrationen in [ng/mL]		
1	97.2	319	533
1	93.8	338	563
2	83.6	281	533
2	106	265	668
3	92.8	317	611
3	95.5	277	631
4	108	372	640
4	95.4	299	641
5	98.5	287	646
5	106	302	704
6	96.9	238	562
6	92.2	297	544
n	12	12	12
Mittelwert	97.1	299	606
Standardabw.	6.82	34.9	57.6
cv [%]	7.0	11.4	9.5
bias [%]	-2.9	-0.2	1.1

Validierung der bioanalytischen Methode

Tabelle 15 Ergebnisse der Interday Richtigkeit und Präzision - Qualitätskontrollproben Nikotinamid

Nikotinamid :	Nominal-Konzentrationen in [ng/mL]		
Analysen-Sequenz	100	300	600
	Berechnete Konzentrationen in [ng/mL]		
1	110	339	527
1	99.5	297	618
2	90.4	271	565
2	87.0	268	770
3	87.2	290	560
3	97.7	291	567
4	107	313	596
4	108	326	629
5	88.5	272	588
5	(66.4) A	303	650
6	89.4	270	535
6	117	267	529
n	11	12	12
Mittelwert	98.3	292	594
Standardabw.	10.7	24.4	68.0
cv [%]	10.9	8.3	11.4
bias [%]	-1.7	-2.5	-0.9

A: Ausreisser (Abweichung > 30%)– wurde für statistische Auswertung nicht verwendet

Validierung der bioanalytischen Methode

Tabelle 16 Ergebnisse der Interday Richtigkeit und Präzision - Qualitätskontrollproben Nikotinursäure

Nikotinursäure :	Nominal-Konzentrationen in [ng/mL]		
Analysen-Sequenz	100	300	600
	Berechnete Konzentrationen in [ng/mL]		
1	101	314	596
1	114	339	648
2	84.0	333	595
2	82.1	299	(885) A
3	92.6	314	556
3	109	295	635
4	101	339	599
4	88.4	306	688
5	98.7	334	644
5	109	321	686
6	97.6	300	563
6	104	318	658
n	12	12	11
Mittelwert	98.5	318	624
Standardabw.	10.1	16.0	45.5
cv [%]	10.3	5.0	7.3
bias [%]	-1.5	5.9	4.0

A: Ausreisser (Abweichung > 30%)– wurde für statistische Auswertung nicht verwendet

Wie aus den Tabellen 11 – 16 ersichtlich ist, werden die internationalen Akzeptanzkriterien (bias für Richtigkeit und cv für Genauigkeit jeweils < 15%) [32,33,34] für die Interday-Genauigkeit und Richtigkeit klar erfüllt.

Validierung der bioanalytischen Methode

Die Parameter der 6 Standardkurven für die jeweiligen Analyten sind in den folgenden Tabellen 17-19 zusammengefasst:

Tabelle 17 Zusammenfassung der Parameter aller Kalibriergeraden - Interday Nikotinsäure

Analysen-Sequenz Nikotinsäure	intercept a	Steigung b	Korrelationskoeffizient r²
1	0.01582	0.00174	0.98105
2	0.00210	0.00184	0.99106
3	0.03464	0.00158	0.98100
4	0.03126	0.00151	0.98818
5	-0.00407	0.00164	0.98349
6	-0.00865	0.00192	0.98713
Mittelwert	0.01185	0.00171	0.98532
Standardabw.		0.00014	0.00411
cv [%]		8.4	0.4

Tabelle 18 Zusammenfassung der Parameter aller Kalibriergeraden - Interday Nikotinamid

Analysen-Sequenz Nikotinamid	intercept a	Steigung b	Korrelationskoeffizient r²
1	0.01264	0.00147	0.99807
2	0.01388	0.00154	0.98515
3	0.01932	0.00138	0.98927
4	0.01258	0.00136	0.99188
5	0.02021	0.00134	0.98314
6	0.00244	0.00155	0.98264
Mittelwert	0.01351	0.00144	0.98836
Standardabw.		0.000085	0.00596
cv [%]		5.9	0.6

Tabelle 19 Zusammenfassung der Parameter aller Kalibriergeraden - Interday Nikotinursäure

Analysen-Sequenz Nikotinursäure	intercept a	Steigung b	Korrelationskoeffizient r^2
1	0.01155	0.00108	0.98636
2	0.01879	0.00113	0.98787
3	0.01844	0.00110	0.99350
4	0.02276	0.00110	0.98561
5	0.00498	0.00099	0.98303
6	0.00649	0.00115	0.98360
Mittelwert	0.01383	0.00109	0.98666
Standardabw.		0.00005	0.00379
cv [%]		4.7	0.4

Die guten Resultate bezüglich Linearität und geringer Schwankung der Geradensteigungen sind ein eindeutiger Beleg für die Robustheit und Eignung der analytischen Methode.

Dennoch ist es bei der Messung von Proben unbekannter Konzentration unerlässlich, einen kompletten Satz von Kalibrier-Standards und einen kompletten Satz Qualitätskontrollproben mitzumessen, da auf diese Weise kleinere Schwankungen der Geradensteigungen von Sequenz zu Sequenz kompensiert werden können und somit die Richtigkeit der Messungen nicht beeinträchtigt wird.

3.3.1.2. Intra-Day Richtigkeit und Genauigkeit

Dieses Experiment soll die Wiederholbarkeit der Messungen innerhalb eines Tages unter den gleichen Messbedingungen aufzeigen.

Hierfür wurden 5 verschiedene Sätze an Qualitätskontrollproben zusammen mit einem kompletten Satz an Kalibrierstandards innerhalb einer Analysensequenz gemessen.

Validierung der bioanalytischen Methode

Die gemessenen Konzentrationen wurden für die Berechnung der Streuung verwendet.

In den folgenden 20-22 sind die Ergebnisse der Intra-Day Präzision und Richtigkeit zusammengefasst:

Tabelle 20 Wiederholbarkeit Intra-Day (n=5) Nikotinsäure

Nikotinsäure :	Nominal-Konzentrationen in [ng/mL]		
	100	300	600
	Berechnete Konzentrationen in [ng/mL]		
	101	292	595
	100	267	605
	112	291	608
	88.3	285	646
	88.2	272	665
Mittelwert	97.8	281	624
Standardabw.	9.86	11.1	30.1
cv [%]	10.1	3.9	4.8
bias [%]	-2.2	-6.2	3.9

Tabelle 21 Wiederholbarkeit Intra-Day (n=5) Nikotinamid

Nikotinamid :	Nominal-Konzentrationen in [ng/mL]		
	100	300	600
	Berechnete Konzentrationen in [ng/mL]		
	102	258	546
	99.2	261	593
	102	258	585
	88.6	286	609
	102	300	597
Mittelwert	98.7	273	586
Standardabw.	5.76	19.4	24.0
cv [%]	5.8	7.1	4.1
bias [%]	-1.3	-9.2	-2.3

Tabelle 22 Wiederholbarkeit Intra-Day (n=5) Nikotinursäure

Nikotinursäure :	Nominal-Konzentrationen in [ng/mL]		
	100	300	600
	Berechnete Konzentrationen in [ng/mL]		
	115	335	633
	101	288	656
	86.6	301	660
	83.4	316	671
	112	297	632
Mittelwert	99.5	307	650
Standardabw.	14.3	18.4	17.3
cv [%]	14.4	6.0	2.7
bias [%]	-0.5	2.4	8.4

Wie aus den Tabellen 20-22 ersichtlich, sind die internationalen Akzeptanzkriterien (bias und cv jeweils < 15%) [32,33,34] für die Intra-Day Genauigkeit und Richtigkeit auch hier klar erfüllt !

3.3.1.3. Kalibrierungsmethode und Linearität

Wie bereits in Kapitel 3.2.4.1 dargestellt wurde die Berechnung der Kalibrierkurven mittels linearer Regression der Peakflächenverhältnisse von Analyt zu Internem Standard vorgenommen.

Um das am besten geeignete Wichtungsmodell zu finden wurden die Kalibriergeraden jeweils ohne Wichtung, mit $1/x$ Wichtung und mit $1/x^2$ Wichtung berechnet.

Aufgrund nicht akzeptabler Abweichungen im unteren Konzentrationsbereich konnten die Berechnungen ohne und mit $1/x$ Wichtung nicht verwendet werden.

Da das Wichtungsmodell $1/x^2$ über den gesamten Kalibrierbereich ausreichend akzeptable Ergebnisse in Bezug auf Richtigkeit und Genauigkeit liefert, wie in den Tabellen 17-19 bereits belegt, wurde es für alle Berechnungen verwendet.

3.3.1.4. Statistische Daten der gesamten Validierung

Während dieser Validierung wurden insgesamt 10 Analysensequenzen mit 10 Standard-Kalibrierungen und 20 Sätzen an Qualitätskontrollproben gemessen.

Die folgenden Tabellen geben einen Überblick über die erhaltenen Resultate :

Tabelle 23 Statistische Daten der Kalibrierung - gesamte Validierung Nikotinsäure

Nominal Konz. [ng/mL]	50.0 (LLOQ)	75.0	125	150	250	500	750
Anzahl (n):	10	10	10	9	10	9	10
Mittelwert:	49.7	73.2	132	152	246	504	727
Standardabw.:	3.54	7.86	9.02	9.82	10.9	39.3	42.3
CV [%]:	7.1	10.7	6.8	6.5	4.4	7.8	5.8
Bias [%]:	-0.7	-2.4	5.6	1.5	-1.6	0.8	-3.1

Tabelle 24 Statistische Daten der Kalibrierung - gesamte Validierung Nikotinamid

Nominal Konz. [ng/mL]	50.0 (LLOQ)	75.0	125	150	250	500	750
Anzahl (n):	10	8	9	10	10	10	10
Mittelwert:	51.2	70.9	126	150	251	505	747
Standardabw.:	2.01	4.76	12.6	8.63	16.7	33.3	56.6
CV [%]:	3.9	6.7	10.0	5.7	6.6	6.6	7.6
Bias [%]:	2.4	-5.5	0.5	0.3	0.6	1.0	-0.4

Validierung der bioanalytischen Methode

Tabelle 25 Statistische Daten der Kalibrierung - gesamte Validierung Nikotinursäure

Nominal Konz. [ng/mL]	50.0 (LLOQ)	75.0	125	150	250	500	750
Anzahl (n):	10	9	9	10	10	9	10
Mittelwert:	49.8	77.6	122	145	251	517	745
Standardabw.:	2.67	5.52	10.6	14.0	12.3	37.4	29.4
CV [%]:	5.4	7.1	8.7	9.7	4.9	7.2	3.9
Bias [%]:	-0.4	3.5	-2.4	-3.5	0.5	3.4	-0.6

Tabelle 26 Statistische Daten der QC-Proben - gesamte Validierung Nikotinsäure

Nominal Konz. [ng/mL]	100	300	600
Anzahl (n):	20	20	20
Mittelwert:	101	303	614
Standardabw.:	7.41	29.1	60.1
CV [%]:	7.4	9.6	9.8
Bias [%]:	0.5	1.0	2.3

Tabelle 27 Statistische Daten der QC-Proben - gesamte Validierung Nikotinamid

Nominal Konz. [ng/mL]	100	300	600
Anzahl (n):	19	20	20
Mittelwert:	98.8	289	603
Standardabw.:	10.5	22.6	61.9
CV [%]:	10.6	7.8	10.3
Bias [%]:	-1.2	-3.7	0.5

Validierung der bioanalytischen Methode

Tabelle 28 Statistische Daten der QC-Proben - gesamte Validierung Nikotinursäure

Nominal Konz. [ng/mL]	100	300	600
Anzahl (n):	18	20	18
Mittelwert:	100	312	634
Standardabw.:	10.3	20.5	47.2
CV [%]:	10.3	6.6	7.4
Bias [%]:	0.0	4.0	5.7

Tabelle 29 Regressionsparameter - gesamte Validierung

Nikotinsäure		
n=10	Steigung b	Korrelation r ²
Mittelwert	0.00164	0.98586
Standardabw.	0.00014	0.00354
cv [%]	8.9	0.4
Nikotinamid		
n=10	Steigung b	Korrelation r ²
Mittelwert	0.00136	0.98828
Standardabw.	0.00015	0.00594
cv [%]	10.8	0.6
Nikotinursäure		
n=10	Steigung b	Korrelation r ²
Mittelwert	0.00108	0.98770
Standardabw.	0.00005	0.00386
cv [%]	4.4	0.4

Die statistischen Ergebnisse belegen eindeutig die gute Reproduzierbarkeit der analytischen Methode sowie die Eignung des internen Standards zur quantitativen Bestimmung mehrerer Analyten.

3.3.1.5. Untere Bestimmungsgrenze - LLOQ

Die untere Bestimmungsgrenze (lower limit of quantitation = LLOQ) ist definiert als die niedrigste Konzentration der Analyten innerhalb der Kalibrierstandards, die zu einer wiederholbaren Messung der Peakflächen führt und mit akzeptabler Präzision und Richtigkeit bestimmt werden kann. Sie wurde für diese analytische Methode auf 50 ng/mL Plasma für alle drei Analyten festgelegt.

Diese wurde dann validiert, indem 6 verschiedene Proben der Konzentration 50 ng/mL jedes Analyten analysiert und mittels einer frisch hergestellten Standardkurve berechnet wurden.

Die Resultate sind in Tabelle 30 zusammengefasst :

Tabelle 30 Validierung Untere Bestimmungsgrenze (LLOQ)

Nominal-Konz. [ng/mL]	Berechnete Konz. [ng/mL] Nikotinsäure	Berechnete Konz. [ng/mL] Nikotinursäure	Berechnete Konz. [ng/mL] Nikotinamid
50.0	50.2	44.2	48.5
50.0	52.1	46.3	43.2
50.0	58.5	47.3	41.6
50.0	50.5	51.2	47.6
50.0	54.0	A *)	51.8
50.0	57.3	A *)	47.7
Mittelwert	53.8	47.3	46.7
Standardabw.	3.51	2.91	3.74
CV [%]	6.5	6.2	8.0
Bias [%]	7.5	-5.5	-6.5

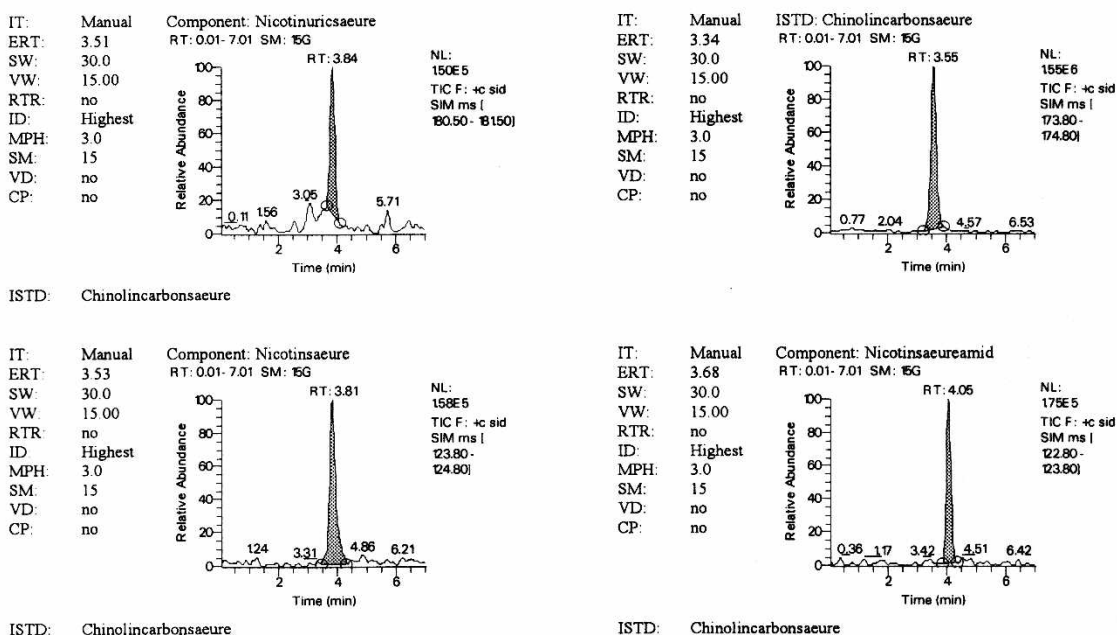
*) A: Ausreisser (Abweichung > 30%) – wurde für die statistische Auswertung nicht verwendet

Validierung der bioanalytischen Methode

Die aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass die Anforderungen an die LLOQ nach den internationalen Akzeptanzkriterien [32,33,34] in Bezug auf Richtigkeit und Genauigkeit (am LLOQ gilt eine Toleranz von $\pm 20\%$) erfüllt sind. Da gemäß den Richtlinien 66% der QC- oder Validierungs-Proben innerhalb der Toleranz ihres Nominalwerts liegen müssen, wird das Ergebnis durch die beiden Ausreisserproben bei der Nikotinsäure nicht beeinträchtigt.

Darüber hinaus ist auch die Bedingung erfüllt, dass der Response der Signale der Analyten am LLOQ mindestens fünfmal so hoch sein muss wie das durchschnittliche Grundrauschen an der entsprechenden Stelle. Folgende Abbildung zeigt die Chromatogramme der Analyten an der unteren Bestimmungsgrenze:

Abbildung 19 NA, NAM und NUR am LLOQ 50 ng/mL



Component Results								
Name	Area	Area Ratio	Area ISTD	Specified Amount	Calculated Amount	%Diff	S/N	BL
Nicotinuricsaeure	1513598	0.075	20232340	50.000 ng/ml	51.387 ng/ml	2.77	19	MB
Chinolincarbonsaeure	20232340	N/A	N/A	250.000 ng/ml	N/A	N/A	73	BM
Nicotinsaeure	2378824	0.118	20232340	50.000 ng/ml	48.208 ng/ml	-3.58	31	MB
Nicotinsaeureamid	1878725	0.093	20232340	50.000 ng/ml	53.263 ng/ml	6.53	41	BM

3.3.2. Selektivität

Unter Selektivität versteht man im Allgemeinen die Abwesenheit von Störsignalen zu den Retentionszeiten, zu denen die Analyten bzw. der Interne Standard eluieren.

Dies wurde durch die Abwesenheit interferierender Peaks in den Chromatogrammen von Blank-Proben, d.h. Proben zu denen gar nichts addiert wurde aber auch Proben, zu denen nur der Interne Standard hinzupipettiert wurde, belegt.

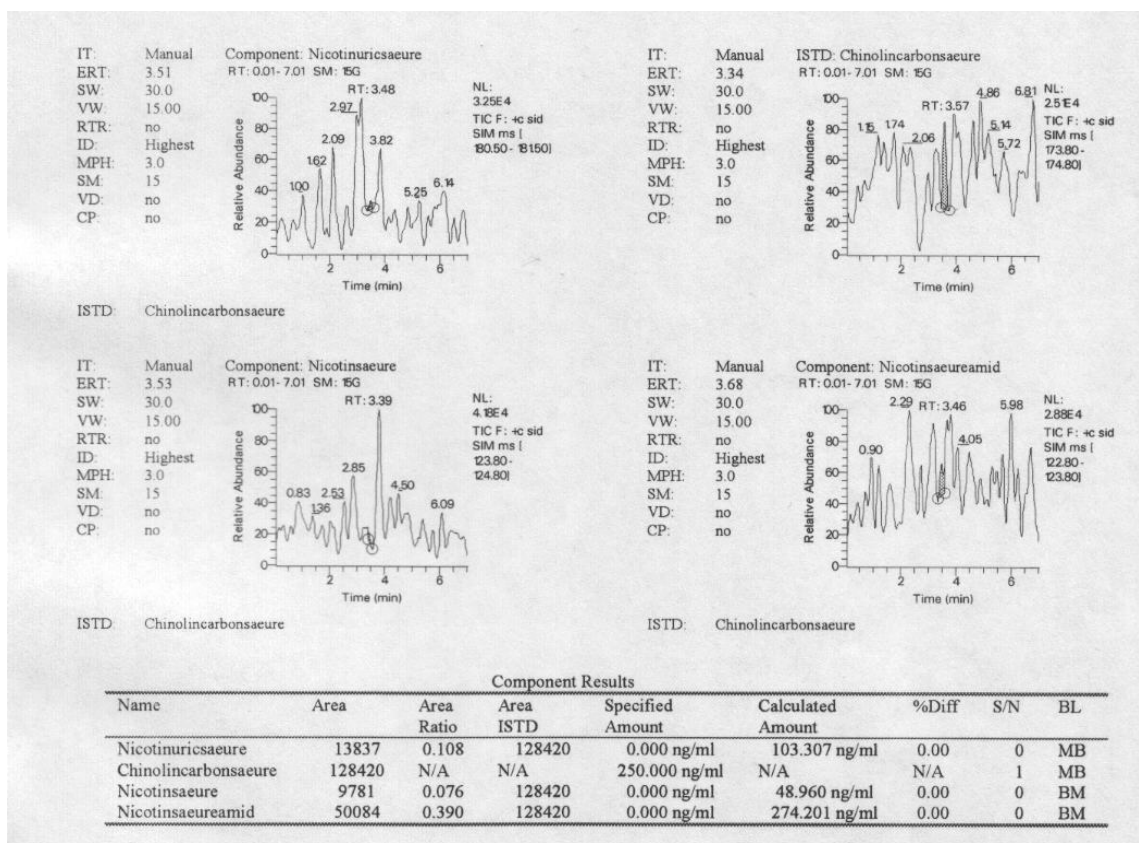
Ferner wurden verschiedene Blutabnahmesysteme getestet.

3.3.2.1. Blank-Matrix

Sechs verschiedene Plasma-Proben von sechs unterschiedlichen Individuen wurden für diesen Test verwendet. Dabei wurden den Plasma Spendern keine Auflagen gemacht, was bestimmte Lebensweisen, wie Rauchen, Kaffeegenuss etc. betrifft.

Diese 6 Blank Proben wurden gemäß der entwickelten Methode extrahiert und analysiert, wobei, wie in Abb. 20 dargestellt, keine signifikanten Störpeaks zu den Retentionszeiten ausgemacht werden konnten, wo andernfalls die Peaks der Analyten bzw. des Internen Standards eluieren.

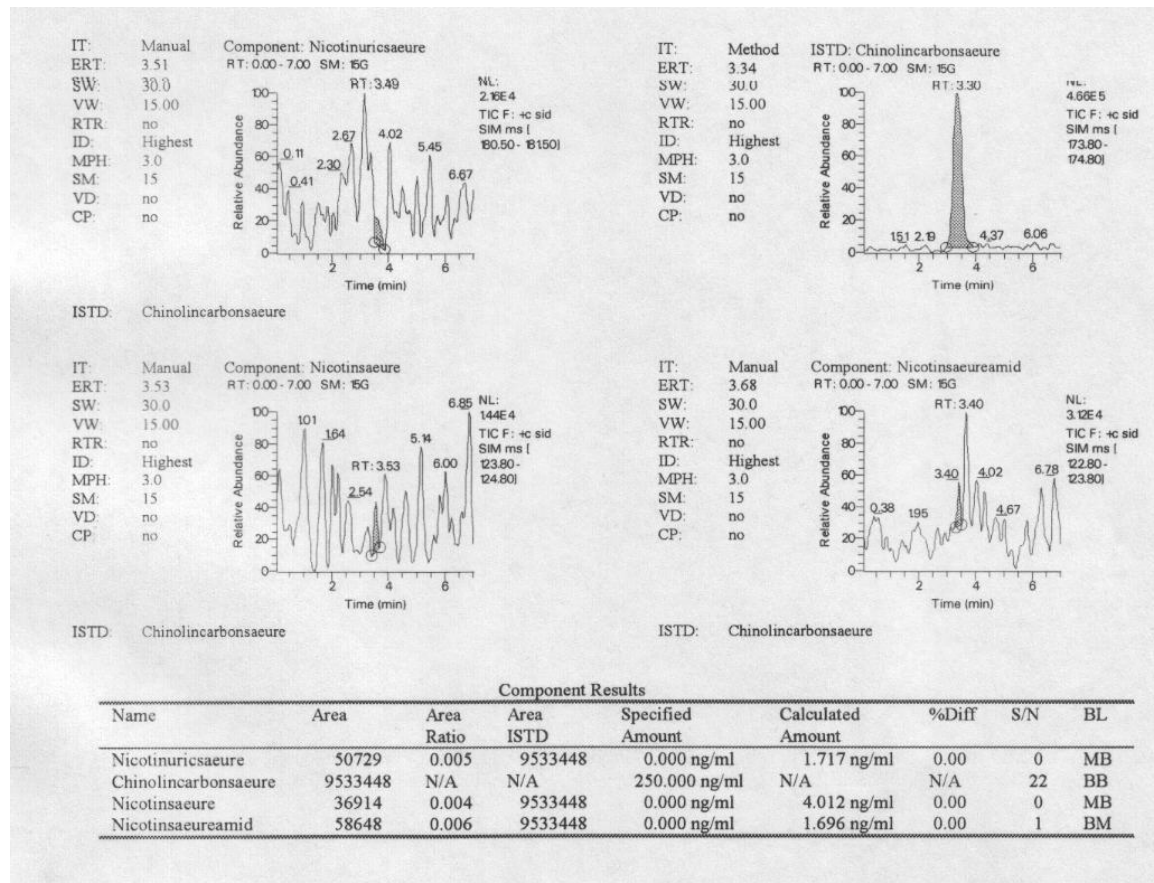
Abbildung 20 Chromatogramm von Blank-Plasma



Validierung der bioanalytischen Methode

Darüber hinaus wurden 6 Proben extrahiert und analysiert, die nur den Internen Standard enthielten, sogenannte Null-Standards. Auch hier waren keine signifikanten Störsignale zu den Retentionszeiten der Analyten zu beobachten (siehe Abbildung 21)

Abbildung 21 Null Standard Chromatogramm



3.3.2.2. Blutabnahmesysteme

Um geeignete Abnahmesysteme und Aufbewahrungsbehältnisse für die Gewinnung von Human-Proben zu finden, wurden 6 verschiedene Blutabnahmesysteme und 2 verschiedene Aufbewahrungsröhrchen getestet.

- Monovette: EDTA: Sarstedt
- Vacutainer: Li-Heparin: Becton-Dickinson
- Vacutainer: Na-Heparin: Becton-Dickinson
- Vacutainer: EDTA-K: Becton-Dickinson
- Polypropylen Röhrchen: Sarstedt
- Glas Röhrchen: VWR (München)

Hierbei wurden jeweils vier Proben der Konzentration 300 ng/mL in die jeweiligen Gefäße pipettiert und die Proben anschliessend 20 min. überkopfgeschüttelt.

Danach wurden die Proben extrahiert und gegen eine frisch extrahierte Kalibrierreihe gemessen.

Dabei ergab sich, dass nur das Li-Heparin Vacutainer System geeignet ist, Blutproben zu entnehmen, da bei allen anderen Systemen signifikante Veränderungen in den Konzentrationen aller Analyten auftraten.

Für die Aufbewahrung ist nur Glas geeignet, da bei Polypropylen Gefäßen eine deutliche Abnahme in den Konzentrationen von Nikotinamid zu beobachten war.

3.3.3. Stabilitätstests

3.3.3.1. Stabilität in Plasma bei Raumtemperatur und Tageslicht

Die Stabilität von NA, NAM und NUR bei Raumtemperatur und Tageslicht wurde untersucht, indem 4 Sätze an Qualitätskontrollproben extrahiert wurden, nachdem sie 24 Stunden dem Tageslicht bei Raumtemperatur ausgesetzt waren.

Die extrahierten Proben wurden anschließend gegen eine Kalibrierreihe vermessen, die unmittelbar nach ihrer Herstellung extrahiert wurde.

In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse dieses Versuches zusammengefasst.

Nur eine signifikante Abnahme in der Konzentration von Nikotinsäure im unteren Konzentrationsbereich konnte beobachtet werden, wohingegen Nikotinamid und Nikotinursäure unter diesen Bedingungen als stabil anzusehen sind.

Möglicherweise spielt hier eine Instabilität der Nikotinsäure gegenüber Oxidantien [79], wie beispielsweise Luftsauerstoff eine Rolle, zumal dieser Effekt ja nur den unteren Konzentrationsbereich betrifft.

Validierung der bioanalytischen Methode

Tabelle 31 Stabilität in Matrix bei 24h RT - Nikotinsäure

Nikotinsäure :	Nominal-Konzentrationen in [ng/mL]		
	100	300	600
	Berechnete Konzentrationen in [ng/mL]		
24h	74.1	252	520
	79.6	256	589
	67.7	301	510
	67.8	255	570
Mittelwert	72.3	266	548
Standardabw.	5.70	23.2	38.2
cv [%]	7.9	8.7	7.0
Bias [%]	-27.7	-11.2	-8.7

Tabelle 32 Stabilität in Matrix bei 24h RT – Nikotinamid

Nikotinamid :	Nominal-Konzentrationen in [ng/mL]		
	100	300	600
	Berechnete Konzentrationen in [ng/mL]		
24h	96.3	342	606
	101	308	674
	103	313	610
	147(A)	307	677
Mittelwert	100	318	642
Standardabw.	3.29	16.4	39.2
cv [%]	3.3	5.1	6.1
bias [%]	0.0	5.9	7.0

*) A: Ausreisser (Abweichung > 30%) – wurde für die statistische Auswertung nicht verwendet

Validierung der bioanalytischen Methode

Tabelle 33 Stabilität in Matrix bei 24h RT – Nikotinursäure

Nikotinursäure :	Nominal-Konzentrationen in [ng/mL]		
	100	300	600
	Berechnete Konzentrationen in [ng/mL]		
24h	105	287	528
	121	285	602
	129	258	539
	110	258	553
Mittelwert	116	272	555
Standardabw.	10.8	16.2	32.3
cv [%]	9.3	6.0	5.8
bias [%]	16.3	-9.2	-7.4

Daher wurde das Experiment für Nikotinsäure wiederholt, die Proben jedoch nur 12 Stunden dem Tageslicht bei Raumtemperatur ausgesetzt.

Unter diesen Bedingungen ist Nikotinsäure stabil. Demnach folgt aus diesem Ergebnis, dass es zweckmässig ist, die Proben bis zur Extraktion gut gekühlt und geschlossen zu halten.

Tabelle 34 Stabilität in Matrix bei 12h RT - Nikotinsäure

Nikotinsäure :	Nominal-Konzentrationen in [ng/mL]		
	100	300	600
	Berechnete Konzentrationen in [ng/mL]		
12h	93.7	363	672
	89.8	284	579
	110	328	601
	69.8 (A)	298	653
Mittelwert	97.9	318	627
Standardabw.	10.7	35.2	43.5
cv [%]	11.0	11.1	6.9
bias [%]	-2.1	6.1	4.4

*) A: aufgrund eines chromatographischen Fehlers wurde dieser Wert für die statistische Auswertung nicht verwendet

3.3.3.2. Stabilität in Plasma bei $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ (Aufbewahrung im Gefrierschrank)

Die Stabilität der Analyten in eingefrorenen Plasma-Proben wurde untersucht, indem 4 Sätze von Qualitäts-Kontrollproben nach einer Lagerung von 64 Tagen im Gefrierschrank bei $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ extrahiert und gegen eine frisch hergestellte Standard Kalibrierkurve gemessen wurden. Folgende Tabellen zeigen die Resultate dieses Experiments:

Tabelle 35 Stabilität in Matrix bei $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ / 64 Tage – Nikotinsäure

Nikotinsäure :	Nominal-Konzentrationen in [ng/mL]		
	100	300	600
	Berechnete Konzentrationen in [ng/mL]		
	94.2	289	533
	96.9	313	530
	83.3	358	542
	88.4	281	581
Mittelwert	90.7	310	547
Standardabw.	6.09	34.5	23.2
cv [%]	6.7	11.1	4.2
bias [%]	-9.3	3.4	-8.9

Tabelle 36 Stabilität in Matrix bei $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ / 64 Tage – Nikotinamid

Nikotinamid :	Nominal-Konzentrationen in [ng/mL]		
	100	300	600
	Berechnete Konzentrationen in [ng/mL]		
	96.8	299	524
	117	266	505
	116	333	526
	108	301	649
Mittelwert	109	300	551
Standardabw.	9.34	27.4	66.1
cv [%]	8.5	9.2	12.0
bias [%]	9.4	-0.1	-8.2

Tabelle 37 Stabilität in Matrix bei $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ / 64 Tage – Nikotinursäure

Nikotinursäure :	Nominal-Konzentrationen in [ng/mL]		
	100	300	600
	Berechnete Konzentrationen in [ng/mL]		
	85.1	350	643
	120	338	517
	102	330	570
	110	328	610
Mittelwert	104	336	585
Standardabw.	14.7	9.91	54.3
cv [%]	14.1	2.9	9.3
bias [%]	4.3	12.1	-2.5

Wie ersichtlich ist, ergaben sich keine Stabilitätsprobleme bei der Aufbewahrung der Proben über 64 Tage hinweg unter den zuvor genannten Bedingungen.

3.3.3.3. Stabilität nach wiederholten Einfrier-/Auftauzyklen

12 Sätze an Qualitätskontrollproben mit je 100, 300 und 600 ng/mL jedes Analyten wurden mehreren Einfrier-/Auftauzyklen unterworfen.

Vier Sätze an QC-Proben wurden vor dem Einfrieren extrahiert. Die anderen 8 Sätze wurden gleichzeitig bei -20°C eingefroren. Vier Sätze davon wurden nach dem ersten Einfrier-/Auftauzyklus extrahiert, die verbleibenden vier Sätze nach dem 3. Einfrier-/Auftauzyklus.

Anschliessend wurden alle Proben gegen eine frisch hergestellte und extrahierte Kalibrierung gemessen.

Validierung der bioanalytischen Methode

Folgende Tabellen geben eine Übersicht über die Ergebnisse:

Tabelle 38 Stabilität nach mehreren Einfrier-/Auftauzyklen - Nikotinsäure

Einfrier-/Auftau-Zyklus	Nominal Konz. [ng/mL]	Mittelwert berechnete Konz.: [n=4; ng/mL]	CV [%]	Bias [%]
0	100	96.2	12.1	-3.8
	300	302	6.1	0.6
	600	623	5.6	3.8
1	100	95.2	12.9	-4.8
	300	325	4.0	8.2
	600	636	4.5	6.0
3	100	85.9	14.9	-14.1
	300	311	3.0	3.6
	600	640	3.0	6.6

Tabelle 39 Stabilität nach mehreren Einfrier-/Auftauzyklen – Nikotinamid

Einfrier-/Auftau-Zyklus	Nominal Konz. [ng/mL]	Mittelwert berechnete Konz.: [n=4; ng/mL]	CV [%]	Bias [%]
0	100	114	11.5	14.2
	300	297	9.3	-1.1
	600	626	4.5	4.3
1	100	95.4	16.0	-4.6
	300	300	9.9	-0.1
	600	607	5.9	1.2
3	100	106	1.2	5.5
	300	280	7.6	-6.7
	600	589	4.0	-1.8

Tabelle 40 Stabilität nach mehreren Einfrier-/Auftauzyklen – Nikotinursäure

Einfrier-/Auftau-Zyklus	Nominal Konz. [ng/mL]	Mittelwert berechnete Konz.: [n=4; ng/mL]	CV [%]	Bias [%]
0	100	99.6	2.0	-0.4
	300	336	6.9	12.0
	600	635	1.3	5.8
1	100	110	14.3	10.2
	300	324	7.5	8.2
	600	634	2.5	5.6
3	100	108	8.9	8.1
	300	318	9.6	6.0
	600	641	6.3	6.9

Man erkennt, dass eingefrorene Plasmaproben bis zu 3 mal ohne signifikante Änderung in den Konzentrationen der Analyten eingefroren und wieder aufgetaut werden können.

3.3.3.4. Stabilität im Extrakt bei Raumtemperatur

Vier Sätze an Qualitätskontrollproben wurden extrahiert und anschliessend 72 Stunden bei Zimmertemperatur ohne Lichtschutz stehen gelassen.

Anschliessend wurden sie mit einem frisch hergestellten und extrahierten Satz von Kalibrier-Standards gemessen. Dabei zeigten sich keine auffälligen Änderungen in den Konzentrationen der Analyten, so dass, falls nötig, die extrahierten Proben mindestens 72 Stunden bis zur Messung aufbewahrt werden können.

Folgende Tabellen zeigen die Ergebnisse dieses Experiments:

Validierung der bioanalytischen Methode

Tabelle 41 Stabilität im Extrakt bei Raumtemperatur / 72 Stunden – Nikotinsäure

Nikotinsäure :	Nominal-Konzentrationen in [ng/mL]		
72h Extrakt RT	100	300	600
	Berechnete Konzentrationen in [ng/mL]		
Mittelwert	96.9	287	552
Standardabw.	6.63	17.8	49.6
cv [%]	6.8	6.2	9.0
bias [%]	-3.1	-4.5	-7.9

Tabelle 42 Stabilität im Extrakt bei Raumtemperatur / 72 Stunden – Nikotinamid

Nikotinamid :	Nominal-Konzentrationen in [ng/mL]		
72h Extrakt RT	100	300	600
	Berechnete Konzentrationen in [ng/mL]		
Mittelwert	109	284	535
Standardabw.	6.93	14.3	74.4
cv [%]	6.4	5.0	13.9
bias [%]	8.6	-5.3	-10.8

Tabelle 43 Stabilität im Extrakt bei Raumtemperatur / 72 Stunden – Nikotinursäure

Nikotinursäure :	Nominal-Konzentrationen in [ng/mL]		
72h Extrakt RT	100	300	600
	Berechnete Konzentrationen in [ng/mL]		
Mittelwert	98.1	294	603
Standardabw.	9.60	25.9	49.6
cv [%]	9.8	8.8	8.2
bias [%]	-1.9	-2.1	0.4

3.3.3.5. Stabilität im Extrakt im Kühlschrank ($5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$), 72h

Hier wurde völlig analog zu 3.3.3.4. vorgegangen, nur dass diesmal die extrahierten Proben vor der Messung gegen eine frisch extrahierte Standardkurve 72h im Kühlschrank bei $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden.

Wie aus dem vorangegangenen Versuch nicht anders zu erwarten war, wurden auch hier keine weiteren Probleme beobachtet, so dass die fertigen Extrakte bis zur Messung ohne Einschränkungen mindestens 72h im Kühlschrank aufbewahrt werden können.

Die folgenden Tabellen fassen die Ergebnisse dieses Versuches zusammen:

Tabelle 44 Stabilität im Extrakt im Kühlschrank ($5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$), 72h - Nikotinsäure

Nikotinsäure :	Nominal-Konzentrationen in [ng/mL]		
72h Extrakt KS	100	300	600
	Berechnete Konzentrationen in [ng/mL]		
Mittelwert	104	284	590
Standardabw.	9.05	15.3	14.0
cv [%]	8.7	5.4	2.4
bias [%]	3.5	-5.2	-1.7

Tabelle 45 Stabilität im Extrakt im Kühlschrank ($5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$), 72h – Nikotinamid

Nikotinamid :	Nominal-Konzentrationen in [ng/mL]		
72h Extrakt KS	100	300	600
	Berechnete Konzentrationen in [ng/mL]		
Mittelwert	94.1	292	603
Standardabw.	11.0	6.15	18.5
cv [%]	11.7	2.1	3.1
bias [%]	-5.9	-2.8	0.5

Tabelle 46 Stabilität im Extrakt im Kühlschrank ($5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$), 72h – Nikotinursäure

Nikotinursäure :	Nominal-Konzentrationen in [ng/mL]		
72h Extrakt KS	100	300	600
	Berechnete Konzentrationen in [ng/mL]		
Mittelwert	93.3	288	638
Standardabw.	9.24	18.2	15.6
cv [%]	9.9	6.3	2.4
bias [%]	-6.7	-4.1	6.4

3.3.3.6. Stabilität im Extrakt im Autosampler , 72h

Da bei dieser Methode mit für LC-MS relativ langen chromatographischen Laufzeiten (8 min.) gearbeitet wurde und sich somit bei größeren Analysensequenzen relativ lange Sequenz-Laufzeiten ergaben, wurde auch die Stabilität der extrahierten Proben im Autosampler getestet. Dabei wurden analog den beiden vorherigen Versuchen 4 Sätze an Qualitäts-Kontrollproben extrahiert, diese anschliessend jedoch 72 Stunden im Autosampler belassen und dann gegen eine frisch extrahierte Kalibrierreihe vermessen.

Auch hier ergaben sich keinerlei Probleme bezüglich der Stabilität der Extrakte.

Tabelle 47 Stabilität im Extrakt im Autosampler , 72h - Nikotinsäure

Nikotinsäure :	Nominal-Konzentrationen in [ng/mL]		
72h Extrakt AS	100	300	600
	Berechnete Konzentrationen in [ng/mL]		
Mittelwert	96.9	287	552
Standardabw.	6.63	17.8	49.6
cv [%]	6.8	6.2	9.0
bias [%]	-3.1	-4.5	-7.9

Tabelle 48 Stabilität im Extrakt im Autosampler , 72h - Nikotinamid

Nikotinamid :	Nominal-Konzentrationen in [ng/mL]		
72h Extrakt AS	100	300	600
	Berechnete Konzentrationen in [ng/mL]		
Mittelwert	109	284	535
Standardabw.	6.93	14.3	74.4
cv [%]	6.4	5.0	13.9
bias [%]	8.6	-5.3	-10.8

Tabelle 49 Stabilität im Extrakt im Autosampler , 72h – Nikotinursäure

Nikotinursäure :	Nominal-Konzentrationen in [ng/mL]		
72h Extrakt AS	100	300	600
	Berechnete Konzentrationen in [ng/mL]		
Mittelwert	98.1	294	603
Standardabw.	9.60	25.9	49.6
cv [%]	9.8	8.8	8.2
bias [%]	-1.9	-2.1	0.4

3.3.3.7. Stabilität während der Probengewinnung (Stabilität in Vollblut)

Um die Stabilität während der Probengewinnung zu untersuchen, wurde Vollblut mit je 300 ng/mL Nikotinsäure, Nikotinamid und Nikotinursäure versetzt,.

Danach wurden 12 Aliquote dieser Vollblutproben entnommen. Vier davon wurden unmittelbar extrahiert, vier weitere nachdem sie 30 min. und schliesslich die restlichen vier nachdem sie 60 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen wurden.

Validierung der bioanalytischen Methode

Eine Übersicht über die Ergebnisse findet sich in der folgenden Tabelle:

Tabelle 50 Stabilität in Vollblut

	Time [min]	Nominal Konzentration [ng/mL] Nikotinsäure	Nominal Konzentration [ng/mL] Nikotinursäure	Nominal Konzentration [ng/mL] Nikotinamid
Matrix		300	300	300
		Berechnete Konzentration [ng/mL] Nikotinsäure	Berechnete Konzentration [ng/mL] Nikotinursäure	Berechnete Konzentration [ng/mL] Nikotinamid
Vollblut	0	137	261	182
	0	240	340	240
	0	234	439	220
	0	205	397	195
Mittelwert		204	359	209
Standardabw.		47.5	76.9	25.9
cv [%]		23.3	21.4	12.4
bias [%]		-32.0	19.8	-30.2
	30	86.7	460	315
	30	165	431	276
	30	146	498	256
	30	130	517	256
Mittelwert		132	476	276
Standardabw.		33.2	38.3	27.7
cv [%]		25.2	8.1	10.1
bias [%]		-56.1	58.8	-8.2
	60	116	454	317
	60	129	599	380
	60	106	422	298
	60	133	538	338
Mittelwert		121	503	333
Standardabw.		12.5	80.4	35.2
cv [%]		10.4	16.0	10.6
bias [%]		-59.7	67.7	11.1

Die gelisteten Ergebnisse weisen auf enorme Veränderungen in den Konzentrationen der drei Analyten hin. Offenbar ist bei Raumtemperatur die Enzymaktivität in frisch gewonnenem Vollblut für die Instabilität der Analyten verantwortlich. Literaturhinweise auf die Überführung der Analyten ineinander gibt es nicht.

Inwieweit die nachgewiesene Instabilität gegenüber Oxidantien [79], wie z.B. Sauerstoff, der sicher noch im frisch gewonnenen Vollblut vorhanden ist, eine Rolle spielt, kann nicht beurteilt werden.

Um die beobachtete Instabilität der Analyten während der Probengewinnung zu vermeiden, ist es demnach notwendig, die Proben so schnell wie möglich herunterzukühlen, zu zentrifugieren und bei -20°C einzufrieren.

Eine Praxis, die sich, wie sich später bei der Vermessung von Studienproben einer klinischen Studie zeigte, bewährt hatte.

Denn wie in den Kapiteln 3.3.3.1 und 3.3.3.2 zur Stabilitätsuntersuchung in Plasma beschrieben worden ist, konnte die Stabilität der Analyten in Plasma unter verschiedenen Bedingungen einwandfrei nachgewiesen werden.

3.3.4. Extraktionsausbeute

Die Ausbeute der Extraktion, die ein Maß für die Vollständigkeit der Extraktion der gesuchten Substanzen aus der Probe darstellt, wurde bestimmt, indem 2 verschiedene Sätze an Plasma Proben untersucht wurden:

- Jeweils 4 Proben der Konzentrationen 100, 300 und 600 ng/mL, wurden mit Internem Standard versetzt und wie gewöhnlich extrahiert.
- Jeweils 12 Proben wurden zunächst nur mit Internem Standard versetzt und dann extrahiert. Anschließend wurden diesen Extrakten die entsprechenden Arbeitslösungen der Analyten hinzupipettiert, so dass wiederum jeweils 4 Proben der Konzentrationen 100, 300 und 600 ng/mL erhalten wurden. Diese Proben dienten somit als 100% Referenz-Proben.

Die Extraktionsausbeute kann nach folgender Gleichung berechnet werden :

$$Ausbeute [\%] = \frac{x_{extr.}}{x_{ref.}} * f * 100$$

(wobei der Faktor f den Bruchteil am Gesamtvolumen angibt, in diesem Fall ist f für alle drei Analyten = 1).

Folgende Tabelle zeigt die ermittelten Extraktionsausbeuten:

Tabelle 51 Extraktionsausbeute

Konzentration [ng/mL]	Recovery [%] Nikotinsäure	Recovery [%] Nikotinamid	Recovery [%] Nikotinursäure
100	87.0	84.7	92.1
300	84.7	86.9	87.1
600	90.4	87.5	88.8
Mittelwert	87.4	86.4	89.1

Auf der Basis dieser guten sowie reproduzierbaren Extraktionsausbeuten für die gesamten Analyten war eine weitere Optimierung des Extraktionsverfahrens nicht erforderlich (cv < 15%).

3.3.5. Probenverdünnung

Bei Proben mit nicht ausreichender Matrix (< 1mL) oder bei Proben deren Gehalt oberhalb der oberen Bestimmungsgrenze der Kalibrierung liegt, ist es notwendig, die Proben vor der Extraktion zu verdünnen. Um zu zeigen, dass dennoch korrekte Ergebnisse nach einem zusätzlichen Verdünnungsschritt erzielt werden können, wurden 2 weitere QC-Pools mit den Konzentrationen 1125 ng/mL bzw. 2250 ng/mL eines jeden Analyten hergestellt.

Jeweils vier Proben jeden Pools wurden zum einen um den Faktor 2, zum anderen um den Faktor 4 mit Blank-Plasma verdünnt, so dass jeweils eine Konzentration von 562.5 ng NA, NAM und NUR pro mL Plasma resultierte.

Diese Proben wurden dann zusammen mit einer „normalen“, also unverdünnten Standardreihe extrahiert und gemessen.

Anhand der mitextrahierten unverdünnten Kalibrierkurve wurden die Proben mit dem Verdünnungsfaktor 2 bzw. 4 zurückgerechnet. Wie aus folgender Tabelle zu entnehmen ist, stimmen die Proben mit ihrem ursprünglichen Nominalwert überein. Dies beweist, dass es möglich ist, die Proben in einer linearen Weise zu verdünnen, so dass letztendlich der Bestimmungsbereich bei

50.0 – 2250 ng/mL Plasma für jeden Analyten liegt!

Tabelle 52 Probenverdünnung – Nikotinsäure

Verdünnungsfaktor	1125 ng/mL	Verdünnungsfaktor	2250 ng/mL
2.0	1098	4.0	2355
	1150		2074
	1105		2444
	1199		N
Mittelwert	1138		2291
Standardabw.	46.44		193.2
cv [%]	4.1		8.4
bias [%]	1.2		1.8

N : nicht verwendet aufgrund eines chromatographischen Fehlers

Tabelle 53 Probenverdünnung – Nikotinamid

Verdünnungsfaktor	1125 ng/mL	Verdünnungsfaktor	2250 ng/mL
2.0	1145	4.0	2126
	1130		2097
	1091		2265
	1159		N
Mittelwert	1131		2163
Standardabw.	29.14		89.84
cv [%]	2.6		4.2
bias [%]	0.6		-3.9

N : nicht verwendet aufgrund eines chromatographischen Fehlers

Tabelle 54 Probenverdünnung – Nikotinursäure

Verdünnungsfaktor	1125 ng/mL	Verdünnungsfaktor	2250 ng/mL
2.0	1117	4.0	2070
	1130		1972
	1041		2270
	1142		N
Mittelwert	1107		2104
Standardabw.	45.50		151.8
cv [%]	4.1		7.2
bias [%]	-1.6		-6.5

N : nicht verwendet aufgrund eines chromatographischen Fehlers

3.4. Akzeptanzkriterien:

Während der gesamten Validierung wurde eine Kalibriergerade nur dann akzeptiert, wenn die rückberechneten Standardkonzentrationen innerhalb der $\pm 15\%$ Grenzen (bzw. $\pm 20\%$ bei der untersten Quantifizierungsgrenze) um ihren Nominalwert lagen sowie der Korrelationskoeffizient $R^2 > 0.98$ war.

Außerdem sollten mindestens 2/3 der analysierten QC-Proben (z.B. 4 von 6) auswertbar sein und nicht mehr als 15% (bzw. $\pm 20\%$ beim QC der untersten Konzentration) von ihrer nominellen Konzentration abweichen, wobei eins von zwei QC's derselben Konzentration dieses Akzeptanzkriterium erfüllen musste. Waren diese Voraussetzungen nicht gegeben, musste der gesamte Lauf wiederholt werden [32,33,34].

3.5. Übersicht über die Validierungsergebnisse

Folgende Tabelle fasst die Ergebnisse der Methodenvvalidierung von Nikotinsäure, Nikotinamid und Nikotinursäure in Humanplasma noch einmal kurz zusammen:

Tabelle 55 Übersicht über die gesamten Validierungsergebnisse

Validierte Parameter	Resultate Nikotin-säure	Resultate Nikotin-amid	Resultate Nikotinur-säure
Kalibrierbereich	50.0 – 750 ng/mL	50.0 – 750 ng/mL	50.0 – 750 ng/mL
LLOQ	50.0 ng/mL	50.0 ng/mL	50.0 ng/mL
r ² (Mittelwert)	0.98586	0.98828	0.98770
Inter-Day Genauigkeit*	CV = 7.0%	CV = 10.9%	CV = 10.3%
Inter-Day Richtigkeit*	Bias = -2.9%	Bias = -1.7%	Bias = -1.5%
Intra-Day Genauigkeit*	CV = 10.1%	CV = 5.8%	CV = 14.4%
Intra-Day Richtigkeit*	Bias = -2.2%	Bias = -1.3%	Bias = -0.5%
Stabilität nach drei Einfrier-/Auftauzyklen	Keine Probleme beobachtet	Keine Probleme beobachtet	Keine Probleme beobachtet
Stabilität extrahierter Proben bei Raumtemperatur	mindestens 72h	mindestens 72h	mindestens 72h
Stabilität extrahierter Proben im Kühlschrank (5°C ± 3°C)	mindestens 72h	mindestens 72h	mindestens 72h
Stabilität in frischem Vollblut	nein	nein	nein
Stabilität in Plasma bei Raum-Temperatur	mindestens 12h	mindestens 24h	mindestens 24h
Stabilität in Plasma bei -20°C ± 5°C	mindestens 64 Tage	mindestens 64 Tage	mindestens 64 Tage
Stabilität extrahierter Proben im Autosampler	mindestens 72h	mindestens 72h	mindestens 72h
Stabilität in Blutabnahmesystemen	Nur Vacutainer Li-Hep ist verwendbar	Nur Vacutainer Li-Hep ist verwendbar	Nur Vacutainer Li-Hep ist verwendbar
Aufbewahrungsgefäße	Keine Probleme beobachtet	Polypropylen ist nicht verwendbar	Keine Probleme beobachtet
Extraktionsausbeute	87.4	86.4	89.1
Probenverdünnung	Keine Probleme beobachtet bei Faktor 2 und 4	Keine Probleme beobachtet bei Faktor 2 und 4	Keine Probleme beobachtet bei Faktor 2 und 4

*) an der untersten QC Konzentration!

Aus Tabelle 55 wird ersichtlich, dass die Validierung der vorgestellten LC-MS Analysenmethode zur simultanen quantitativen Bestimmung von Niacin, Niacinamid und Nikotinursäure in Humanplasma gemäß aktueller Richtlinien [32,33,34] durchgeführt wurde.

Darüberhinaus wurden bei sämtlichen Experimenten die Prinzipien der „Guten Laborpraxis“ -GLP- streng beachtet.

Zusammenfassend hat die Validierung der entwickelten Methode folgendes ergeben:

- Die Methode erfüllt sämtliche Anforderungen in Bezug auf Linearität sowie Richtigkeit, Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der quantitativen Bestimmungen für alle drei Analyten.
- Um die beobachtete Instabilität der Analyten während der Plasmagewinnung aus Vollblut zu vermeiden, ist es notwendig, die Proben so schnell wie möglich herunterzukühlen, zu zentrifugieren und bei -20°C einzufrieren.
- Die Analyten sind in Plasma bei verschiedenen Temperaturen sowie nach mehreren Einfrier- und Auftauzyklen ausreichend stabil, so dass die Proben sowohl beim Probentransport als auch in der täglichen Routine mühelos zu handhaben sind.
- Probenextrakte, die durch die Aufarbeitung gewonnen werden, sind ausreichend stabil, um auch im Rahmen von länger andauernden Analysensequenzen gemessen werden zu können.
- Proben mit ungenügendem Probenvolumen oder deren Gehalt den validierten Kalibrierbereich übersteigt, können problemlos bis zu einem Faktor 4 verdünnt werden.

Die Methode erfüllt somit für alle drei Analyten die allgemein gültigen Anforderungen an die Validierung bioanalytischer Methoden und kann problemlos in der Praxis eingesetzt werden, wie sich im folgenden Kapitel zeigt.

3.6. Pharmakokinetische Ergebnisse aus klinischen Studien

Nach Abschluss der Validierung konnten Humanplasma Proben aus einer klinischen Bioäquivalenzstudie zu 1000 mg Niacin Tabletten, die bei AAI Development Services durchgeführt wurde, erfolgreich mit der beschriebenen Methode vermessen werden. Der validierte Konzentrationsbereich war ausreichend, um alle drei Analyten über den gesamten Blutentnahmezeitraum von 36 h zu detektieren und plausible Ergebnisse zu erhalten.

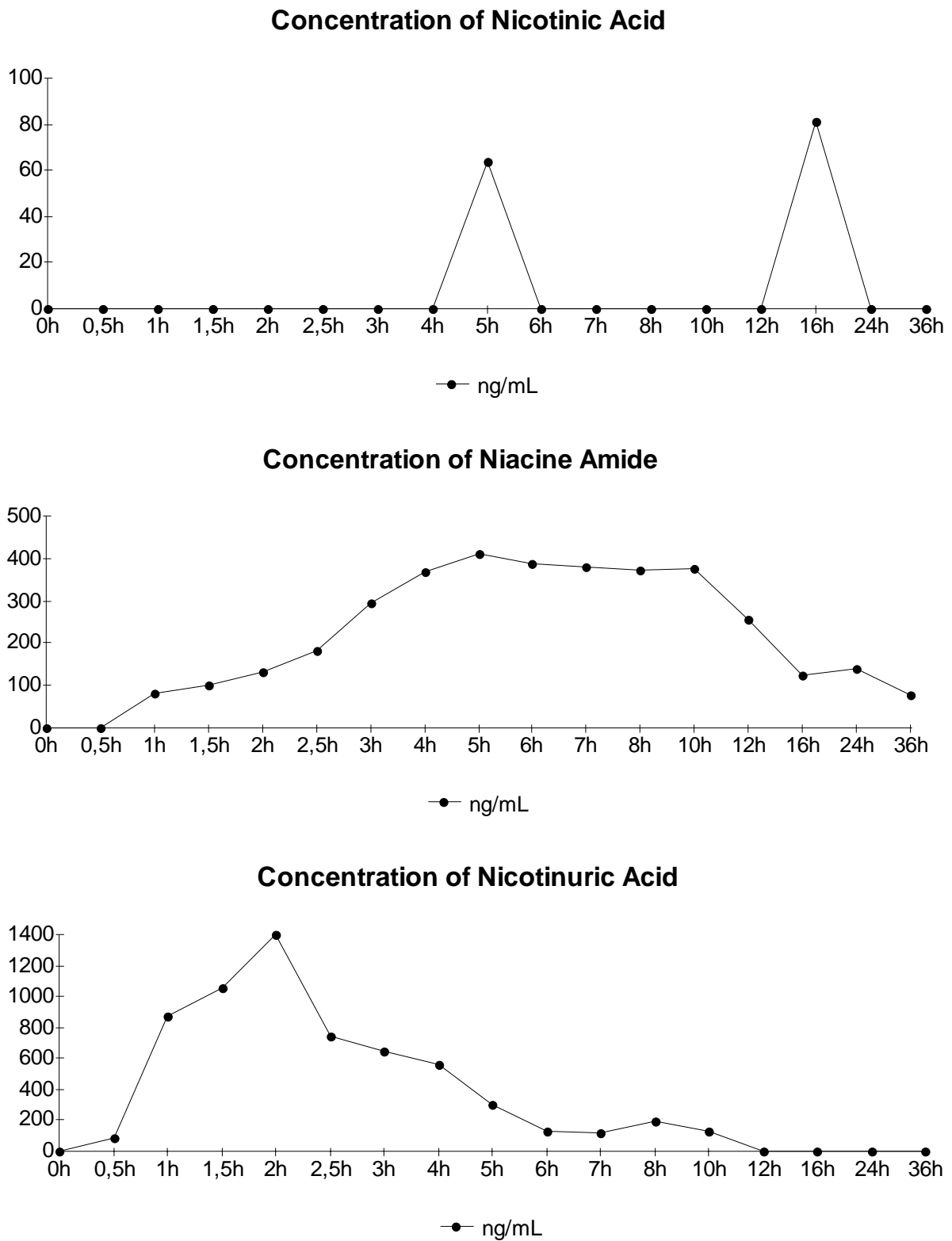
Die Konzentrationsverläufe der drei Analyten über die Dauer der Studie sind in der Abbildung 22 dargestellt.

Wie erwartet, lagen die Konzentrationen an Nikotinsäure auf Grund des schnellen Metabolismus sehr nahe bei, aber doch meist unter der unteren Bestimmungsgrenze.

Die höchste Konzentration an Nikotinamid betrug 500 ng/mL Plasma und wurde ca. 5h nach der Einnahme erreicht.

Nikotinursäure, als Hauptmetabolit, erreichte seinen Spitzenwert von 1500 ng/mL bereits nach ca. 2h, was eine Verdünnung der Proben erforderte.

Abbildung 22 Repräsentative Konzentrationsverläufe von NA, NAM und NUR in Probanden



Diese Ergebnisse decken sich mit Resultaten, die früher aus pharmakokinetischen Studien gewonnen wurden:

a) Niacin:

Es konnte gezeigt werden, dass die Plasmaspiegel von Niacin sehr stark von der Dosis aber auch der Formulierung des verabreichten Wirkstoffs abhängen.

So wurde bereits beschrieben, dass Niacin bei oraler Dosierung sehr rasch absorbiert und metabolisiert wird und in einigen Fällen kein freies Niacin mehr in Plasma und Urin detektiert werden kann [45]. Die Eliminierungshalbwertszeit von Niacin liegt dabei zwischen 20 und 45 Minuten. In einem direkten Vergleich wurde gezeigt, dass bei der Verabreichung schnell freisetzender Formulierungen die Plasmaspiegel an Niacin bis zu einem Faktor 100 höher liegen als bei denen der langsamer freisetzenden [80]. Im Falle eines raschen Anstiegs der Plasmaspiegel an Niacin resultierten allerdings einige Nebenwirkungen wie Durchfallerscheinungen und hauptsächlich Hautverfärbungen im Gesicht [10,11,12].

Aus diesem Grund wurden Niacin-Formulierungen entwickelt, die den Wirkstoff langsamer freigeben, um damit die mit einer raschen Absorption verbundenen Nebenwirkungen zu vermeiden, [81,82].

Da im vorliegenden Fall ebenfalls eine langsam freisetzende Formulierung dosiert wurde, ist es demnach nicht verwunderlich, dass die Plasmaspiegel von Niacin sehr niedrig liegen.

b) Nikotinursäure

Nikotinursäure hat sich in bislang allen Studien als der Metabolit erwiesen, der seine maximale Konzentration am schnellsten nach der Einnahme erreicht, nämlich innerhalb von ungefähr 1.5 – 2 Stunden [25,80].

Auch dieses Erkenntnis deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, wo C_{\max} nach ca. 2 Stunden erreicht wurde.

c) Niacinamid

In der Literatur wird angegeben, dass Niacinamid seine maximale Konzentration im Plasma ca. 3 - 4 Stunden nach der Administration erreicht [25], während in der vorliegenden Studie der maximale Plasmaspiegel nach 5 Stunden gemessen wurde.

Angesichts der Tatsache, dass hier eine andere Formulierung eingesetzt wurde, widerspricht dieser Befund jedoch früher gewonnenen Erkenntnissen in keiner Weise.

Durch die bei AAI Deutschland GmbH durchgeführte Studie ist demnach gezeigt worden, dass die vorgestellte Methode zur quantitativen Bestimmung von Niacin und dessen Metaboliten in Humanplasma alle Anforderungen erfüllt, um in klinischen Studien erfolgreich eingesetzt werden zu können.

Zusammenfassung

Niacin ist neben seiner Bedeutung als Vitamin im menschlichen Organismus ein seit langem bekannter Wirkstoff bei der Therapie von Fettstoffwechselstörungen.

Sein großer Vorteil gegenüber anderen Lipidsenkern liegt in der positiven Beeinflussung aller bedeutenden Lipid – Bestandteile im Blut.

Es wird im menschlichen Organismus sehr rasch metabolisiert. Die beiden Hauptmetaboliten sind das Nikotinamid und die Nikotinursäure. Angesichts der pharmakologischen und therapeutischen Bedeutung von Niacin, spielt die Analytik dieser Verbindung sowie seiner Metaboliten eine wichtige Rolle, zumal Niacin aktuell in immer weiteren Präparaten (unter anderem in Form von Kombipräparaten) weiterentwickelt und eingesetzt wird.

Es überraschte daher, dass bislang in der Literatur keine LC-MS Methode zur Bestimmung von Niacin beschrieben war, wo sich doch die LC-MS in den letzten Jahren zur vorherrschenden Analysetechnik für die Analyse von Biomolekülen und Wirkstoffen in biologischen Matrices entwickelt hat, da sie in der Regel geringe Anforderungen an die Probenaufarbeitung stellt und einen hohen Probendurchsatz erlaubt.

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch erstmals gezeigt werden, dass LC-MS eine leistungsfähige Methode zur simultanen, quantitativen Bestimmung von Nikotinsäure, Nikotinamid und Nikotinursäure in Humanplasma darstellt.

Die vorgestellte Methode beweist hohe Selektivität, Empfindlichkeit, Genauigkeit, Richtigkeit und Reproduzierbarkeit im Konzentrationsbereich von 50.0 – 750 ng/mL Plasma für alle drei Analyten bei relativ kurzer Analysenzeit.

Verglichen mit früher entwickelten Methoden ist keine zeitaufwendige Probenaufarbeitung notwendig. Alle drei Analyten konnten in einem Schritt mit einer einzigen Festphasenextraktion ohne zeitaufwendige Derivatisierungsschritte aus Plasma extrahiert werden.

Die Validierung dieser Methode wurde gemäß aktuell geltender Standards durchgeführt.

Alle ermittelten Validierungsparameter wie Spezifität, Linearität, Präzision, Richtigkeit, Reproduzierbarkeit, untere Quantifizierungsgrenze und Stabilität lagen innerhalb der vorgegebenen Grenzen. Damit erfüllt die entwickelte LC-MS Methode die allgemein gültigen Anforderungen an die Validierung bioanalytischer Methoden.

Innerhalb einer klinischen Bioäquivalenz-Studie zu 1000 mg Niacin Tabletten, die erfolgreich bei AAI Development Services durchgeführt wurde, konnten gute und plausible Ergebnisse erzielt werden. Der validierte Konzentrationsbereich war ausreichend um alle drei Analyten zufriedenstellend zu detektieren.

Damit zeigt sich, dass diese entwickelte LC-MS Methode eine leistungstarke Alternative zur simultanen Bestimmung von Niacin und seinen Hauptmetaboliten darstellt, welche erfolgreich in pharmakokinetischen oder toxikokinetischen Studien eingesetzt werden kann.

Die in dieser Dissertation vorgestellte Analysenmethode wurde inzwischen in der Fachliteratur publiziert [83].

Eine Kopie dieser Publikation ist dieser Arbeit beigelegt.

Summary

Niacin, a vitamin of the B-Series, is pharmaceutical used to help lowering high cholesterol and fat levels in the blood. This may help prevent medical problems caused by cholesterol and fat clogging the blood vessels.

Niacin for use in the treatment of high cholesterol is long time available in various dosage forms.

So it was surprising that in literature no method could be found to determine niacin levels in human plasma by LC-MS which is actually the most used analytical method to analyze drugs in plasma or urine due to its relative simple sample work-up and short runtimes during measurements.

In this work a sensitive, specific, accurate, and reproducible HPLC-MS-method for the simultaneous quantitative determination of niacin and its main metabolites niacinamide and nicotinuric acid in human plasma using chinolin-3-carboxylic acid as an internal standard was developed and validated according to international guidelines for method validation. All analytes and the internal standard were separated from acidified plasma by solid phase extraction. Afterwards the extracted samples were analyzed by HPLC/MS in the positive electrospray ionization mode (ESI) and selected ion monitoring (SIM). The total run time was 7 min between injections. The assay had a lower limit of quantification of 50.0 ng/mL for each analyte using 1 mL of plasma. The calibration curves were linear in the measured range between 50.0 and 750 ng/mL plasma. The overall precision and accuracy for all concentrations of quality controls and standards was better than 15%. No indications were found for possible instabilities of niacin, niacinamide and nicotinuric acid in plasma at -20 degrees C, in the extraction solvent or after repeated thawing/freezing cycles. The recovery of the extraction method ranged from 86 to 89% for the three analytes.

The described method was already successfully used to determine niacin and its metabolites in human plasma within the frame of a pharmacokinetic study and is also published in literature[83].

Literaturverzeichnis

- [1] Superko HR, Differential effect of two nicotinic acid preparations on low-density lipoprotein subclass distribution in patients classified as low-density lipoprotein pattern A, B, or I., *Am J Cardiol.* 2004 Sep 1;94(5):588-94.
- [2] Goldberg A., Multiple-dose efficacy and safety of an extended-release form of niacin in the management of hyperlipidemia.
Am J Cardiol. 2000 May 1;85(9):1100-5.
- [3] Morgan JM, The effects of niacin on lipoprotein subclass distribution, *Prev Cardiol.* 2004 Fall;7(4):182-7; quiz 188.
- [4] Carlson LA., Niaspan, the prolonged release preparation of nicotinic acid (niacin), the broad-spectrum lipid drug, *Int J Clin Pract.* 2004 Jul;58(7):706-13.
- [5] Berra K., Clinical update on the use of niacin for the treatment of dyslipidemia, *J Am Acad Nurse Pract.* 2004 Dec;16(12):526-34.
- [6] Illingworth 1994 *Arch Intern Med.* 1994 Jul 25;154(14):1586-95
- [7] Hoeg, An approach to the management of hyperlipoproteinemia
JAMA, 255 (1986), 512-521)
- [8] Canner, Fifteen year mortality in coronary drug project patients: Long term benefit with niacin *JACC*, 8 (1986), 1245-1255
- [9] Carlson, Reducton of mortality in the Stockholm ischaemic heart disease secondary prevention study by combined treatment with clofibrate and nicotinic acid *Acta.Med.Scand.*, 223 (1988), 405-418
- [10] W.B. Parsons, J.H. Flinn, *Arch.Intern.Med.* 103 (1955) 783
- [11] L.A. Carlson, L. Orö, J. Östmann, *Acta. Med. Scand.* 183 (1968) 457
- [12] N. Svedmyr, L. Harthon, Lundholm, *Clin. Pharmacol. Ther.* 111 (1969) 10
- [13] Blum, current therapy for hyperlipoproteinemia
JAMA, 261 (1989), 3582-3587
- [14] Drood, nicotinic acid for the treatment of hyperlipoproteinemia
J.Clin.Pharmacol., 31 (1991), 641-650
- [15] N.Svedmyr, L.Harthon and L. Lundholm
Clin.Pharm. Ther. , 10 (1069), 559
- [16] N.Svedmyr and L.Harthon
Acta Pharmacol. Toxicol., 28 (1970), 66

Literaturverzeichnis

- [17] American Hospital Formulary Service
(1997), 1359
- [18] N. Hengen, V. Seiberth, M. Hengen, Clin. Chem. 24, (1978) 1740-1743.
- [19] J. X. de Vries, W. Gunthert, R. Ding, J. Chromatogr. 221, (1980) 161-165.
- [20] K. Takikawa, K. Miyazaki, T. Arita, J. Chromatogr. 233, (1982) 343-348.
- [21] T. Tsuruta, K. Kohashi, S. Ishida, Y. Ohkura, J. Chromatogr. 309, (1984) 309.
- [22] K. Shibata, Agric. Biol. Chem. 52, (1988) 2973 - 2976
- [23] M. R. L. Stratford, M. F. Dennis, J. Chromatogr. 582, (1992) 145 - 151.
- [24] M. Pelzer, S. Northcott, G. Hansou, J. Liq. Chromatogr. 16, (1993) 2563 – 2570.
- [25] Y. Miyauchi, N. Sano, T. Nakamura, Int. J. Vitam. Nutr. Res. 63, (1993) 145 – 149.
- [26] P. K. Zarzycki, P. Kowalski, J. Nowakowska, H. Lamparczyk, J. Chromatogr. A 709, (1995) 203-208.
- [27] I. N. Papadoyannis, G. K. Tsioni, V. F. Samanidou, J. Liw, Chromatogr. Relat. Technol. 20, (1997) 3203 – 3231
- [28] C. Musfeld, J. Biollaz, N. Belaz, U. W. Kesselring, L. A. Decosterd, J. Pharm. Biomed. Anal. 24(3), (2001) 391-404.
- [29] M. Iwaki, E. Murakami, M. Kikuchi, A. Wada, T. Ogiso, Y. Oda, K. Kubo, K. Takehi, J. Chromatogr. B 716, (1998) 335 - 342.
- [30] Becker.-B ; Hummel,-K, Ein neues Verfahren zur Bestimmung von Nikotinsäure in Plasma Arzneimittelforschung. 1990 May; 40(5) : 573-5
- [31] U. Kollenkirchen, J. Harmeyer, J. Vet. Med., Ser. A 36 (1989) 253
- [32] Shah VP et al. , Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic studies Pharmaceutical Research 1992, 9 (4): 588-592
- [33] Shah VP et al. , Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies J Pharm Sci 1992, 81 (3): 309-312
- [34] U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation
- [35] G. J. Hageman, R. H. Stierum, Mutat. Res. 475, (2001) 45-56.

Literaturverzeichnis

- [36] Fruchart JC. Mechanism of action of hypolipemic drugs J Pharm Belg. 1992 Jul-Aug;47(4):345-350
- [37] Steinhilber, Schubert-Zsilavecz, Roth, Medizinische Chemie - Targets und Arzneistoffe, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart 2005
- [38] Kaffarnik H, Muhlfellner G, Muhlfellner O, Schneider J, Hausmann L, Zofel P, Schubotz R, Fuchs F., Beta-sitosterin in the treatment of essential type II hyperlipoproteinemias, Fortschr Med. 1977 Dec 8;95(46):2785-2787
- [39] J. A. Pieper, Am. J. Manag. Care 8 (12Suppl), (2002) S 308-S 314.
- [40] Tunaru S, Kero J, Schaub A, Wufka C, Blaukat A, Pfeffer K, Offermanns S., Nat Med. 2003 Mar;9(3):352-355. Epub 2003 Feb 03
- [41] Pike NB, Identification of a nicotinic acid receptor: is this the molecular target for the oldest lipid-lowering drug?, Curr Opin Investig Drugs. 2004 Mar;5(3):271-5.
- [42] K. Shibata, T. Kawada, K. Iwai, J. Chromatogr. 417 (1987) 173
- [43] M.S. Brown, J.L. Goldstein, Drugs used in the treatment of hyperlipoproteinemias in A.G. Gilman Pharmacological Basis of Therapeutics, Pergamon Press, Inc, New York, 1990, 874-896
- [44] K.K. Reddi, E. Kodicek, Biochem. J. (1953) 286
- [45] J.E. Mrocheck, R.L. Jolly, D.S. Young, W.J. Turner, Clin. Chem. 22 (1976) 1821
- [46] M. Iwaki, E. Murakami, K. Kakehi, Chromatographic and capillary electrophoretic methods for the analysis of nicotinic acid and its metabolites, Journal of Chromatography B, 747 (2000) 229-240
- [47] C.M. Ward, V.C. Trenerry, I. Pant, Food Chem. 58 (1997) 185
- [48] C. Bernofsky, Anal. Biochem. 96 (1979) 189
- [49] N. Grossowicz, E. Sherstinsky, J. Biol. Chem. 167 (1941) 101
- [50] H. Baker, O. Frank, L. Pasher; A. Dinnerstein, H. Sobotska, Clin. Chem. 6 (1960) 36
- [51] E. Bandier, J. Hald, Biochem. J. 33 (1939) 264
- [52] L.A. Carlson, Clin. Chim. Acta 13 (1966) 349

Literaturverzeichnis

- [53] H.R. Bollonger, A. König, Vitamins in E. Stahl, Thin Layer Chromatography, Springer Verlag, 1969
- [54] A. Tanaka, M. Iijima, Y. Kikuchi, Y. Hohino, N. Nose, J. Chromatogr. 466 (1989) 307
- [55] R.C. Terry, M. Simon, J. Chromatogr. 232 (1982) 261
- [56] A. Somogyi, D. Siebert, F. Bochner, Anal. Biochem. 187 (1990) 160
- [57] Frey/Zieloff, Qualitative und quantitative DC, 1992, Verlag Chemie
- [58] Laub R.J. J., Am. Chem. Soc., 1976, 98: S. 30
- [59] Scott R.P.W., J. Chromatogr., 1979, 171: S. 37-48
- [60] Soczewinski E., J. Chromatogr., 1987, 388: S. 91-98
- [61] Snyder L.R., Principles of Adsorption Chromatography, 1968, New York: Marcel Dekker
- [62] Soczewinski E., Anal. Chem., 1969, 41: S. 179
- [63] Horvath Cs., J. Chromatogr., 1976, 125: S. 129-158
- [64] Horvath Cs., Int. Lab., 1978, 11/12: S. 11-35
- [65] Dill K.A., J. Phys. Chem., 1987, 7: . 1980-1988
- [66] M.Dole et al., J. Chem. Phys., 1968, 49, 2240
- [67] M.Yamashita, J.B.Fenn, J. Chem. Phys., 1984, 88, 4451
- [68] M.Yamashita, J.B.Fenn, J. Chem. Phys., 1984, 88, 4671
- [69] King, J. Amer. Soc. Mass. Spectrom., 2000, 11
- [70] CD-ROM LCQ-Usermeeting 2001, mit freundlicher Genehmigung der Firma ThermoFinnigan MAT GmbH Barkhausenstr. 2, D-28197 Bremen
Telefon: +49-421-5493-0 Telefax: +49-421-5493-396
- [71] W. Paul und H. Steinwedel, Z. Naturforschung 8a, 1953, 448
- [72] Chromatographie Applications No. 01004 und No. 01015, Fa. Grom Analytik, D-72108 Rottenburg-Hailfingen
- [73] Gloor, R. and Johnson, E.L., Practical aspects of reverse phase ion pair chromatographie, J. Chromatogr.Sci. 1977, 15, 413
- [74] U. Kollenkirchen, J. Harmeyer, J. Vet. Med., Ser. A 36 (1989) 247
- [75] K. Shibata, T. Kawada, K. Iwai, J. Chromatogr. 424 (1988) 23
- [76] K. Shibata, T. Kawada, K. Iwai, J. Chromatogr. 422 (1987) 257
- [77] T. Hirayama, K. Uda, T. Watanabe, S. Fukui, Vitamins 62 (1988) 145

- [78] M. Iwaki, T. Ogiso, H. Hayashi, E.T. Lin, L.Z. Benet, J. Chromatogr. B 661 (1994) 154-158
- [79] AHFS Drug Information 1997 S. 2811-2813
- [80] Neuvonen, Roivas, Laine, Sundholm, The bioavailability of sustained release nicotinic acid formulations, J. clin. Pharmac. 32 (1991) 473-476
- [81] [Henkin Y., Johnson K., Segrest J.P., Rechallenge with crystalline niacin after drug induced hepatic failure from sustained-release niacin, J. Am. med. Ass. 264 (1990) 243
- [82] Hodis H.N., Acute hepatic failure associated with use of low-dose sustained release niacin, J. Am. Med. Ass. 264 (1990) 181
- [83] P.Pfuhl, U. Kärcher, N.Häring, A.Baumeister, Mona Abdel Tawab und M. Schubert-Zsilavecz, Simultaneous determination of niacin, niacinamide and nicotinuric acid in human plasma, J. Pharm. Biomed. Anal. 2005 Jan 04, 36(5), 1045-1052

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Bestimmungsgrenzen in Plasma mittels HPLC-UV	17
Tabelle 2	Lösemittel, Reagenzien und Festphasen(SPE)-Säulen	60
Tabelle 3	Laborgeräte und LC-Geräte	60
Tabelle 4	Referenzsubstanzen	61
Tabelle 5	Herstellungsschema der Arbeitslösungen zur Herstellung der Kalibrierstandards	63
Tabelle 6	Herstellungsschema der Arbeitslösungen der Qualitäts-Kontrollproben.....	64
Tabelle 7	Arbeitslösung Interner Standard Chinolin-3-carbonsäure	64
Tabelle 8	LC Bedingungen	65
Tabelle 9	MS Bedingungen – allgemeine Parameter.....	66
Tabelle 10	Scan- Parameter	67
Tabelle 11	Ergebnisse der Interday Richtigkeit und Präzision - Nikotinsäure	70
Tabelle 12	Ergebnisse der Interday Richtigkeit und Präzision - Nikotinamid	71
Tabelle 13	Ergebnisse der Interday Richtigkeit und Präzision - Nikotinursäure	71
Tabelle 14	Ergebnisse der Interday Richtigkeit und Präzision - Qualitätskontrollproben Nikotinsäure.....	72
Tabelle 15	Ergebnisse der Interday Richtigkeit und Präzision - Qualitätskontrollproben Nikotinamid	73
Tabelle 16	Ergebnisse der Interday Richtigkeit und Präzision - Qualitätskontrollproben Nikotinursäure.....	74
Tabelle 17	Zusammenfassung der Parameter aller Kalibriergeraden - Interday Nikotinsäure.....	75
Tabelle 18	Zusammenfassung der Parameter aller Kalibriergeraden - Interday Nikotinamid.....	75
Tabelle 19	Zusammenfassung der Parameter aller Kalibriergeraden - Interday Nikotinursäure	76
Tabelle 20	Wiederholbarkeit Intra-Day (n=5) Nikotinsäure	77
Tabelle 21	Wiederholbarkeit Intra-Day (n=5) Nikotinamid	77
Tabelle 22	Wiederholbarkeit Intra-Day (n=5) Nikotinursäure	78
Tabelle 23	Statistische Daten der Kalibrierung - gesamte Validierung Nikotinsäure	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 24	Statistische Daten der Kalibrierung - gesamte Validierung Nikotinamid	79
Tabelle 25	Statistische Daten der Kalibrierung - gesamte Validierung Nikotinursäure	80
Tabelle 26	Statistische Daten der QC-Proben - gesamte Validierung Nikotinsäure	80
Tabelle 27	Statistische Daten der QC-Proben - gesamte Validierung Nikotinamid	80
Tabelle 28	Statistische Daten der QC-Proben - gesamte Validierung Nikotinursäure	81
Tabelle 29	Regressionsparameter - gesamte Validierung	81
Tabelle 30	Validierung Untere Bestimmungsgrenze (LLOQ)	82
Tabelle 31	Stabilität in Matrix bei 24h RT - Nikotinsäure	87
Tabelle 32	Stabilität in Matrix bei 24h RT – Nikotinamid	87
Tabelle 33	Stabilität in Matrix bei 24h RT – Nikotinursäure	88
Tabelle 34	Stabilität in Matrix bei 12h RT - Nikotinsäure	88
Tabelle 35	Stabilität in Matrix bei –20°C ± 5°C / 64 Tage – Nikotinsäure	89
Tabelle 36	Stabilität in Matrix bei –20°C ± 5°C / 64 Tage – Nikotinamid	89
Tabelle 37	Stabilität in Matrix bei –20°C ± 5°C / 64 Tage – Nikotinursäure	90
Tabelle 38	Stabilität nach mehreren Einfrier-/Auftauzyklen - Nikotinsäure	91
Tabelle 39	Stabilität nach mehreren Einfrier-/Auftauzyklen – Nikotinamid	91
Tabelle 40	Stabilität nach mehreren Einfrier-/Auftauzyklen – Nikotinursäure	92
Tabelle 41	Stabilität im Extrakt bei Raumtemperatur / 72 Stunden – Nikotinsäure	93
Tabelle 42	Stabilität im Extrakt bei Raumtemperatur / 72 Stunden – Nikotinamid	93
Tabelle 43	Stabilität im Extrakt bei Raumtemperatur / 72 Stunden – Nikotinursäure	93
Tabelle 44	Stabilität im Extrakt im Kühlschrank (5°C ± 3°C), 72h - Nikotinsäure	94
Tabelle 45	Stabilität im Extrakt im Kühlschrank (5°C ± 3°C), 72h – Nikotinamid	94
Tabelle 46	Stabilität im Extrakt im Kühlschrank (5°C ± 3°C), 72h – Nikotinursäure	95
Tabelle 47	Stabilität im Extrakt im Autosampler , 72h - Nikotinsäure	95
Tabelle 48	Stabilität im Extrakt im Autosampler , 72h - Nikotinamid	96

Tabellenverzeichnis

Tabelle 49	Stabilität im Extrakt im Autosampler , 72h – Nikotinursäure.....	96
Tabelle 50	Stabilität in Vollblut.....	97
Tabelle 51	Extraktionsausbeute.....	99
Tabelle 52	Probenverdünnung – Nikotinsäure.....	100
Tabelle 53	Probenverdünnung – Nikotinamid	101
Tabelle 54	Probenverdünnung – Nikotinursäure.....	101
Tabelle 55	Übersicht über die gesamten Validierungsergebnisse	102

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Metabolisierung von Niacin	14
Abbildung 2	schematischer Aufbau eines LC-MS Systems :.....	19
Abbildung 3	Aufbau einer HPLC-Anlage	20
Abbildung 4	Retentionsmodelle (nach Frey/Zieloff).....	22
Abbildung 5	Schema eines Tandem-Massenspektrometers	26
Abbildung 6	Schema des ESI-Prozesses.....	27
Abbildung 7	Schema der Ion Trap.....	30
Abbildung 8	Schema eines LCQ – Ion Trap Massenspektrometers	32
Abbildung 9	Full Scan - MS Spektren von NA, NAM und NUR , ESI, positiver Ionenmodus.....	37
Abbildung 10	SIM Chromatogramm von NA, NAM und NUR, auf Ultra IBD und mobiler Phase MeOH:0.1% HCOOH =99:1	42
Abbildung 11	Chromatogramme der Analyten aus reiner Lösung und nach Extraktion aus Plasma	48
Abbildung 12	Vergleich Lösungsmittel- und Blank-Probe.....	50
Abbildung 13	Full Scan Chromatogramm einer Blank-Probe	52
Abbildung 14	Chromatogramm einer mit 100 ng/mL dotierten Probe auf Cyanopropyl-Säule aus Wasser.....	54
Abbildung 15	Funktionsweise des SPE Ionentauschers	55
Abbildung 16	Kalibrierkurve Nikotinsäure.....	58
Abbildung 17	Kalibrierkurve Nikotinamid.....	58
Abbildung 18	Kalibrierkurve Nikotinursäure	59
Abbildung 19	NA, NAM und NUR am LLOQ 50 ng/mL	83
Abbildung 20	Chromatogramm von Blank-Plasma.....	84
Abbildung 21	Null Standard Chromatogramm.....	85
Abbildung 22	Repräsentative Konzentrationsverläufe von NA, NAM und NUR in Probanden.....	105

Lebenslauf – Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name: Peter Pfuhl
geboren am: 28.12.1965
in: Laupheim, Kreis Biberach
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet, 1 Sohn

Anschrift: Neue Heimat 13
88400 Biberach
Tel: 07351 / 579570

Berufserfahrung:

- seit 01.03.1999 Angestellter für die Durchführung von Bioanalysen bei AAI Deutschland GmbH, Neu Ulm
- seit September 2005 Prüfleiter (Bioanalytik), allein Verantwortlicher für die Durchführung der Bioanalytik von klinischen pharmakokinetischen oder toxikokinetischen Studien
 - März 1999 – September 2005 Projektbetreuer
 - seit Juli 2004 zusätzlich zuständig für die Betreuung und Anleitung der Auszubildenden Chemielaboranten in Theorie und Praxis
 - Zahlreiche gehaltene Vorträge über Bioanalytik bei nationalen und internationalen Anwendertreffen
- 01.08.1998 – 30.09.1998 Wissenschaftliche Hilfskraft für den Lehrbereich Analytische Chemie an der Universität Ulm für die Durchführung von Chemie-Tutorien für Diplom-Biologen

Lebenslauf – Curriculum Vitae

01.05.1988 – 01.04.1999 Angestellter der Stadt Biberach für die Wartung der technischen Anlagen eines Lehrschwimmbeckens (u.a. Durchführung von Wasseranalysen auf Chlorgehalt und pH-Wert, Justierung der Meß- und Regeltechnik)

Ausbildung:

seit 12.11.2001 externer Doktorand an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt. Thema der Dissertation:
„Entwicklung, Validierung und Anwendung einer LC-MS Methode zur quantitativen Bestimmung von Niacin und zweier Metaboliten in Humanplasma“
publiziert im „Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis“, Volume 36, Issue 5, 4 January 2005, 1045-1052

Februar 1998 mündliche Diplomprüfungen

März – November 1998 Diplomarbeit in der Abteilung für Analytische Chemie und Umweltchemie der Universität Ulm Thema: „Trennung von organischen Nitraten mittels Dünnschichtchromatographie“ bei Prof. Dr. Karlheinz Ballschmiter
Abschluß als Diplom-Chemiker

ab 01.10.1986 Chemiestudium an der Universität Ulm

1976 – 1985 Wieland Gymnasium in Biberach
Abschluß Abitur (Note 1.5)

1972 – 1976 Gaisental Grundschule in Biberach

Lebenslauf – Curriculum Vitae

Wehrdienst:

01.07.1985 – 30.09.1986 Grundwehrdienst bei Stab/Stabskompanie Pionierkommando 2 in Ulm, Ausbildung zum Stabsdienstsoldaten

Auszeichnungen:

1986 Auszeichnung mit der „Ehrenmedaille der Bundeswehr“

Erklärung und Eidesstattliche Versicherung

Erklärung und Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, den.....

.....

Peter Pfuhl

**P.Pfuhl, U. Kärcher, N.Häring, A.Baumeister,
Mona Abdel Tawab und M. Schubert-Zsilavec**

“Simultaneous determination of niacin, niacinamide
and nicotinuric acid in human plasma”

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Volume 36, Issue 5,
4 January 2005, 1045-1052